

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

**CARACTÉRISATION DU TRANSPORT TRANSÉPITHÉLIAL DE
CADMIUM DANS LES CELLULES INTESTINALES HUMAINES TC7
CULTIVÉES SUR FILTRES**

**MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE**

**PAR
PASCALE CARRIÈRE**

JUIN 2009

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier ma directrice de recherche Catherine Jumarie pour la confiance qu'elle a eu envers moi, pour sa patience, son support constant et sa gentillesse. Mon projet n'a pas toujours été facile à mener mais Catherine a toujours été là pour me guider et m'épauler. Merci aussi à mes collègues : Marc, Guillaume, Loubna ainsi que Christian, Isabelle et Mariane pour leur précieux support et pour les bons moments passés ensemble. Merci surtout de m'avoir apporté quelque chose de précieux dans la vie en général mais surtout pendant la maîtrise: le rire ! Un gros merci à mon amoureux Alain pour sa grande patience, sa dévotion, ses nombreux encouragements, son attitude positive contagieuse et son sens de l'humour. Mais surtout Alain, MERCI de m'avoir trouvée et d'être entré dans ma vie. Merci aussi à tous mes amis pour leur appui constant. Sans eux, je n'aurais probablement pas eu l'énergie, ni le courage de passer à travers ces années d'études. Merci à ma petite famille au grand cœur ; ma mère Lucc, ma grand-mère Micheline, mon grand-père Jean-Paul, mon oncle Yves, sa conjointe Manon et leur trois belles filles Frédérique, Marie-Kim et Charlotte. Ils ont été là pour moi depuis mes débuts dans la vie ou presque.

En terminant, un merci très spécial à Sébastien sans qui je ne serais jamais retournée aux études, encore moins à l'université. Merci d'avoir cru en moi depuis le début. Au moment où j'écris ces lignes, Sébastien lutte contre un cancer. Il s'en sortira, j'en suis convaincue.

À mon grand-père, le meilleur vétérinaire de la terre, pour m'avoir transmis son amour du monde vivant. Il était si fier de me voir entrer à l'université. Malheureusement, il est décédé quelques mois avant ma graduation.

Grand-papa, ce mémoire est pour toi.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|--|------|
| LISTE DES FIGURES | vii |
| LISTE DES TABLEAUX ET ÉQUATIONS | ix |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES | xi |
| LISTE DES SYMBOLES..... | xiii |
| RÉSUMÉ | xiv |
| INTRODUCTION | 1 |
| PREMIÈRE PARTIE : MISE EN CONTEXTE DE L'ÉTUDE ET JUSTIFICATION DE LA DÉMARCHE EXPÉRIMENTALE | 2 |
| CHAPITRE I | |
| LE CADMIUM DANS L'ENVIRONNEMENT | 3 |
| 1.1 Propriétés physico-chimiques du cadmium | 3 |
| 1.2 Les différentes utilisations du cadmium | 4 |
| 1.3 Pénétration et niveaux dans l'environnement | 5 |
| 1.3.1 Le cadmium dans l'air..... | 6 |
| 1.3.2 Le cadmium dans les sols..... | 7 |
| 1.3.3 Le cadmium dans l'eau | 7 |
| 1.3.4 Le cadmium dans les aliments | 8 |
| CHAPITRE II | |
| LE CADMIUM DANS LES SYSTÈMES BIOLOGIQUES..... | 9 |
| 2.1 Toxicocinétique..... | 9 |
| 2.1.1 Absorption | 9 |
| 2.1.2 Distribution..... | 10 |
| 2.1.3 Excrétion..... | 10 |
| 2.2 Toxicité | 11 |
| 2.2.1 Impact de la spéciation sur la biodisponibilité et la toxicité..... | 11 |
| 2.2.2 Toxicité aiguë | 11 |
| 2.2.3 Toxicité chronique..... | 12 |

| | |
|--|----|
| CHAPITRE III | |
| PHYSIOLOGIE INTESTINALE | 17 |
| 3.1 Physiologie intestinale | 17 |
| 3.2 Modèles cellulaires | 20 |
| 3.2.1 Le modèle Caco-2 | 20 |
| 3.2.2 TC7, un clone de Caco-2 | 22 |
| CHAPITRE IV | |
| TRANSPORT MEMBRANAIRE DE CADMIUM | 23 |
| 4.1 Interactions entre le cadmium et le calcium | 23 |
| 4.2 Interactions entre le cadmium et le fer | 24 |
| 4.3 Interactions entre le cadmium et le zinc | 24 |
| 4.4 Impact de la spéciation sur le transport membranaire | 25 |
| 4.5 Transporteurs membranaires | 25 |
| 4.5.1 Superfamille des transporteurs ABC | 25 |
| 4.5.2 Superfamille des SLC | 30 |
| CHAPITRE V | |
| PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE | 35 |
| 5.1 Problématique | 35 |
| 5.2 Objectifs de recherche | 35 |
| 5.3 Hypothèses | 36 |
| 5.4 Méthode expérimentale | 36 |
| DEUXIÈME PARTIE : PRÉSENTATION DES RÉSULTATS ET DISCUSSION | 38 |
| CHAPITRE VI | 39 |
| ARTICLE : CHARACTERIZATION OF TRANSEPTITHELIAL TRANSPORT OF CADMIUM IN TC7 CELL MONOLAYERS GROWN ON FILTERS | 39 |
| 6.1 Abstract | 40 |
| 6.2 Introduction | 41 |
| 6.3 Material and methods | 44 |
| 6.3.1 Cell culture | 44 |
| 6.3.2 Integrity of cell monolayers | 44 |
| 6.3.3 Basolateral Cd accumulation and transport measurements | 45 |
| 6.3.4 Apical Cd efflux measurement | 46 |
| 6.3.5 Data analysis | 47 |
| 6.3.6 Materials | 48 |
| 6.4 Results | 49 |
| 6.5 Discussion | 55 |
| 6.6 References | 63 |
| 6.7 Legends to figures | 68 |

| | |
|---|----|
| CHAPITRE VII | 86 |
| DISCUSSION | 86 |
| 7.1 Retour sur les objectifs de recherche | 86 |
| 7.1.1 Objectif 1 : Caractériser le transport transépithélial du côté BL vers le côté AP dans les cellules TC7. | 86 |
| 7.1.2 Objectif 2 : Évaluer quels transporteurs sont impliqués dans le transport du Cd et dans quelle proportion ils y jouent un rôle. | 87 |
| 7.2 Retour sur l'approche scientifique | 88 |
| 7.2.1 La technique utilisée | 88 |
| 7.2.2 Modèle cellulaire | 89 |
| 7.3 Projet d'étude par rapport à la problématique initiale | 90 |
| 7.4 Perspectives futures | 91 |
| CONCLUSION | 94 |
| RÉFÉRENCES | 96 |

LISTE DES FIGURES

| Figure | | Page |
|--------|---|------|
| 3.1 | Représentation de l'appareil digestif humain (vulgaris-medical, 2008).... | 17 |
| 3.2 | Entérocyte polarisé caractérisé par des microvillosités du côté apical (http://www.solvobiotech.com)..... | 19 |
| 3.3 | Image obtenue par transmission d'électrons d'une cellule Caco-2 après sa différenciation (Pranav <i>et al.</i> , 2006)..... | 21 |
| 4.1 | Structure secondaire des transporteurs MRP1 et MRP5 (Borst <i>et al.</i> , 1999). | 27 |
| 4.2 | Localisation des transporteurs MRP et sens du transport de chacun (Borst <i>et al.</i> , 1999)..... | 28 |
| 4.3 | Structure secondaire du transporteur MDR1 (Higgins <i>et al.</i> , 1997)..... | 29 |
| 4.4 | Structure secondaire du transporteur OCT1 (Jonker et Schinkel, 2003)... | 32 |
| 6.1 | Basolateral cellular accumulation of 0.5 μM ^{109}Cd and monitoring of formation of TC7 cells monolayer grown on filters by measuring the TEER..... | 71 |
| 6.2 | Integrity of 21-days old TC7 cells monolayer grown on filters and exposed to 0.5 μM ^{109}Cd at the BL side over 8-h..... | 72 |
| 6.3 | Time course of 0.5 μM ^{109}Cd cellular accumulation and transepithelial transport at AP and BL sides in 10 and 21 days-old TC7 cell monolayers grown on filters..... | 73 |
| 6.4 | Short-term basolateral cellular accumulation of 0.5 μM ^{109}Cd in 21-days-old TC7 cell monolayers grown on filters..... | 74 |
| 6.5 | Effect of an excess unlabeled Cd in the uptake medium on short-term basolateral cellular accumulation of 0.5 μM ^{109}Cd in 21-days old TC7 cells grown on filters..... | 75 |
| 6.6 | Effect of metal speciation and pH ($_{\text{out}}$) on short-term basolateral cellular accumulation of 0.5 μM ^{109}Cd in 21-days old TC7 cells grown on filters.. | 76 |
| 6.7 | Effect of metal interactions on short-term basolateral cellular accumulation of 0.5 μM ^{109}Cd in 21-days old TC7 cells grown on filters.. | 77 |

| | | |
|------|---|----|
| 6.8 | Basolateral cellular accumulation and transepithelial transport of 0.5 μM ^{109}Cd in 21-days old TC7 cells grown on filters in the presence and in the absence of three OCT1 inhibitors over a 1-h exposure..... | 78 |
| 6.9 | Effect of Cd complexation by albumin on the short-term basolateral cellular accumulation of 0.5 μM ^{109}Cd on 21-days-old TC7 cells grown on filters..... | 79 |
| 6.10 | Effect of two endocytosis inhibitors on short-term basolateral cellular accumulation of 0.5 μM ^{109}Cd in the absence or presence of 300 μM albumin..... | 80 |
| 6.11 | Kinetics of Cd efflux from 21-days old TC7 cells pre-exposed to 0.5 μM ^{109}Cd at the apical side for 2-h in the presence and in the absence of unlabeled Cd in efflux medium..... | 81 |
| 6.12 | Cd efflux in the presence or in the absence of verapamil and probenecid in 21-days old TC7 cells pre-exposed to 0.5 μM ^{109}Cd on the apical side for 2-h..... | 82 |

LISTE DES TABLEAUX ET ÉQUATIONS

Tableaux

| Tableau | | Page |
|----------------|---|-------------|
| 1.1 | Propriétés physico-chimiques du Cd. (ATSDR, 1999)..... | 4 |
| 4.1 | Résumé des transporteurs MRP ainsi que de leur nomenclature utilisée dans la littérature (Borst <i>et al.</i> , 1999)..... | 26 |
| 6.1 | Cd speciation in chloride medium at pH 5.5, 7.4 and 8.5..... | 83 |
| 6.2 | Cd speciation in nitrate medium at pH 5.5, 7.4 and 8.5. | 83 |
| 6.3 | Inhibition percentage of cellular accumulation of Cd in presence of different metals (Cd, Fe, Zn and Fe + Zn) on 0.5 μM ^{109}Cd in pH 7.4 and pH 8.5 after a 3-min basolateral exposition at in absence of Ca..... | 84 |
| 6.4 | Cadmium speciation in function of increasing concentration of albumin (Source: Pham <i>et al.</i> , 2004)..... | 84 |
| 6.5 | Parameters of ^{109}Cd cellular release in the presence or the absence of 100 μM unlabeled Cd in the efflux medium following pre-incubation at AP side..... | 85 |
| 6.6 | Efflux parameter describing the effects of verapamil and probenecid on cellular ^{109}Cd release and efflux medium tracer contents after 30-min of efflux following pre-incubation at the AP side. | 85 |

Équations

Équation 6.1

$$A = A_{\max} (1 - e^{-kt}) + A_0$$

Équation 6.2

$$A = vt + A_0$$

Équation 6.3

$$E = (E_0 - E_e)e^{-k_e t} + E_e$$

Équation 6.4

$$R = R_e (1 - e^{-k_R t})$$

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

| | |
|----------------------------------|-----------------------------------|
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| ARNm | Acide ribonucléique messenger |
| As | Arsenic |
| Ca | Calcium |
| Cd | Cadmium |
| Cl ⁻ | Chlorure |
| CdCl _n ²⁻ⁿ | Chlorocomplexes de cadmium |
| CdAlb | Complexe cadmium-albumine |
| CdMT | Complexe cadmium-métallothionéine |
| Fe | Fer |
| Hg | Mercure |
| K | Potassium |
| Ni | Nickel |
| NO ₃ ⁻ | Nitrate |
| Pb | Plomb |
| Zn | Zinc |

PRODUITS CHIMIQUES

| | |
|-------|--|
| DMEM | Dulbecco's modified Eagle essential minimum medium |
| EDTA | Acide éthylènediaminotétraacétique |
| FBS | <i>Fetal bovine serum</i> (Sérum bovin foetal) |
| HEPES | 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid |

PROTÉINES

| | |
|--------|---|
| Alb | Albumine |
| BSA | Bovine serum albumin |
| GLUT | Facilitated glucose transporter |
| MDR1 | Multi Drug Resistance 1 |
| MRP2 | Multi Drug Resistance Protein 2 |
| MT | Métallothionéine |
| NRAMP2 | Protéine associée à la résistance naturelle du macrophage 2 |
| OCT1 | Organic cation transporter 1 |
| OCT2 | Organic cation transporter2 |
| OCT3 | Organic cation transporter 3 |
| SGLT | Sodium Glucose Link Transporter |

AUTRES ABRÉVIATIONS

| | |
|----------|-----------------------|
| pH | Potentiel d'hydrogène |
| <i>t</i> | Tonnes |

LISTE DES SYMBOLES

| | |
|-----------|--|
| [] | Concentration |
| % | Pourcentage |
| °C | Degrés Celsius |
| A | Accumulation de cadmium (pmol/mg protéine) |
| A_0 | Accumulation de cadmium initiale (pmol/mg protéine) |
| A_{max} | Accumulation de cadmium à l'équilibre (pmol/mg protéine) |
| E_0 | Accumulation cellulaire de ^{109}Cd au temps d'efflux zéro |
| E_e | Plateau atteint lors d'efflux cellulaire de ^{109}Cd |
| k | Constante de temps (min^{-1}) |
| k_a | Constante d'accumulation (min^{-1}) |
| k_E | Constante d'efflux (min^{-1}) |
| K_m | Constante d'affinité (μM) |
| K_i | Constante d'inhibition (μM) |
| k_R | Constante d'accumulation (min^{-1}) |
| R | Relargage cellulaire de ^{109}Cd dans le milieu d'efflux (pmol/mg protéine) |
| R_{max} | Relargage maximal de ^{109}Cd dans le milieu d'efflux (pmol/mg protéine) |
| $t_{1/2}$ | Demi-vie (min) |
| v | vitesse d'accumulation initiale de ^{109}Cd (pmol/min/mg protéine) |

RÉSUMÉ

L'absorption intestinale de Cd, un métal toxique auquel la population générale est exposée par l'alimentation, a été largement étudiée mais aucune étude n'a considéré l'épithélium intestinal comme organe excréteur de Cd. Lors d'intoxications chroniques, le Cd circulant dans le sang pourrait être transporté à l'intérieur de l'entérocyte du côté basolatéral (BL). L'excrétion du Cd pourrait se faire par efflux du côté apical (AP) de l'entérocyte ou par accumulation du Cd dans l'entérocyte jusqu'à sa mort par apoptose lors du renouvellement de l'épithélium intestinal. L'objectif de notre étude a été de caractériser le transport de Cd du côté BL vers le côté AP en utilisant comme modèle *in vitro* les cellules TC7 cultivées sur filtres, un clone hautement différencié de la lignée enterocytaire humaine Caco-2. Les hypothèses suivantes ont été testées: 1) un transporteur de cations organiques (OCT1) pourrait transporter le Cd du côté BL; 2) un système de type MDR ou MRP pourrait être impliqué dans l'efflux AP de Cd. Nos résultats démontrent une stimulation de l'accumulation BL à pH 8,5 en milieu chlorure mais pas en milieu nitrate suggérant une implication d'OCT1 dans le transport des CdCl_n^{2-n} mais pas du Cd^{2+} . La cimetidine, un inhibiteur d'OCT1, a diminué de 37 % le transport de ^{109}Cd après 1h d'exposition à 0,5 μM de traceur. L'efflux AP de 30 min était inhibé de 19 % en présence d'inhibiteurs de MDR1 et MRP2, soient le vérapamil et le probenecid. Nos résultats suggèrent qu'OCT1 à la membrane BL ainsi que MDR1 et MRP2 à la membrane AP sont impliqués dans le transport de Cd dans les cellules TC7. De plus, la présence de Cd non radioactif dans le milieu d'efflux a stimulé l'efflux AP de ^{109}Cd . Ces résultats suggèrent l'implication d'un mécanisme de contre-échange différent de MDR1 et MRP2 qui sont strictement des mécanismes d'efflux. Notre étude a donc démontré que l'épithélium intestinal, tout comme le foie et les reins, pourrait jouer un rôle dans l'excrétion de Cd lors d'intoxications chroniques.

Mots clés : Transport membranaire; Cd; OCT1; MRP2; MDR1; Basolatéral; Épithélium intestinal; Caco-2

INTRODUCTION

Depuis quelques années, la pollution de l'environnement par les métaux lourds a pris de l'importance. Ces derniers, en plus d'être toxiques à de faibles concentrations, ont tendance à s'accumuler dans les organismes vivants car leur taux d'excrétion est plus faible que le taux d'absorption. Cette accumulation concerne tous les métaux lourds dont le cadmium (Cd) sur lequel se concentre cette étude.

La population générale est exposée au Cd via l'ingestion quotidienne d'aliments contaminés. Il existe donc un risque d'intoxication chronique réel au sein de la population. Une fois dans l'organisme, le Cd peut être excrété, quoique très peu, par le foie ou les reins mais à ce jour, aucune étude n'a abordé l'épithélium intestinal comme un organe excréteur du Cd.

Dans cette étude, nous avons donc tenté d'établir si l'épithélium intestinal peut véritablement être perçu comme organe d'excrétion pouvant contrer, du moins en partie, l'accumulation de Cd dans l'organisme. En ciblant l'implication de transporteurs dont certains ont déjà été identifiés pour transporter le Cd dans le rein ou le foie, nous avons tenté de déterminer si le Cd circulant dans le sang pourrait être pris en charge du côté sanguin des entérocytes pour ensuite être excrété dans la lumière intestinale.

Dans la première partie de ce mémoire, le Cd dans l'environnement et son comportement dans les systèmes biologiques seront abordés. Nous introduirons aussi les concepts de physiologie intestinale pertinents à la présente étude ainsi que les transporteurs membranaires susceptibles de transporter le Cd. Nous présenterons par la suite, la problématique ainsi que nos objectifs de recherches. La seconde partie comportera nos résultats présentés sous forme d'article suivi d'une discussion générale.

PREMIÈRE PARTIE

MISE EN CONTEXTE DE L'ÉTUDE ET JUSTIFICATION DE LA DÉMARCHE EXPÉRIMENTALE

CHAPITRE I

LE CADMIUM DANS L'ENVIRONNEMENT

Contrairement aux autres substances toxiques, les métaux ne peuvent être ni créés, ni détruits par l'homme. C'est lors de leur utilisation que leur potentiel toxique peut être modifié. En effet, ils peuvent être transportés dans l'environnement suite à diverses activités anthropiques se retrouvant ainsi dans l'eau, le sol et l'air. Leur spéciation, ou forme chimique, peut aussi être altérée, accroissant ainsi leur potentiel de toxicité (Beijer et Jernelov, 1986).

Depuis longtemps, l'homme connaît le potentiel toxique des métaux. Déjà en 370 avant JC, Hippocrate décrivait les coliques abdominales chez un sujet dont l'occupation était l'extraction de métaux (Casarett, Klaassen et Watkins, 2003). À l'époque, des métaux comme le plomb (Pb) étaient utilisés pour la sculpture tandis que l'arsenic (As) servait à la décoration de tombeaux égyptiens. Quant au mercure (Hg), il était utilisé pour amalgamer l'or et l'argent. De nos jours, la toxicité de ces métaux est encore d'actualité mais un métal plus récemment utilisé fait de plus en plus parler de lui, il s'agit du cadmium (Cd) qui est le sujet de cette étude.

1.1 Propriétés physico-chimiques du cadmium

Le Cd est un métal lourd ayant été découvert en 1817 par un chimiste allemand du nom de Friedrich Stromeyer. Le Cd est classé dans le groupe IIb du tableau périodique avec d'autres métaux lourds tels que le zinc (Zn) et le Hg.

Bien que l'on puisse le retrouver à deux degrés d'oxydation différents soit 0 et +2, il est rarement retrouvé sous sa forme d'oxydation 0 (forme métallique) mais plutôt sous sa

forme oxydée Cd^{2+} . Cette forme cationique possède une grande affinité pour les donneurs d'électrons avec lesquels elle peut former plusieurs complexes.

Le Cd élémentaire est insoluble dans l'eau. Par contre, plusieurs de ses composés le sont. C'est le cas des formes chlorure (CdCl_2), bromure (CdBr_2), iodure (CdI_2), nitrate [$\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$] et sulfate (CdSO_4) (Budavari *et al.*, 1989). Les composés du Cd insolubles dans l'eau, comme l'oxyde de Cd (CdO), le sulfure de Cd (CdS), le carbonate de Cd (CdCO_3), l'ortho-phosphate de Cd [$\text{Cd}_3(\text{PO}_4)_2$] et le fluorure de Cd (CdF_2), peuvent être solubilisés dans certaines conditions d'oxydation ou d'acidité élevée.

Le Cd est un métal d'un blanc argenté ayant des propriétés physiques proches de celles du Zn. Lors de son ébullition, il se dégage des vapeurs toxiques de couleur jaune. C'est un métal ductile et malléable qui résiste à la corrosion atmosphérique, ce qui en fait un excellent revêtement pour les métaux ferreux (Gouvernement du Canada/Environnement Canada/Santé Canada, 1994). Certaines de ses propriétés physico chimiques sont résumées dans le tableau 1.1 ci-dessous.

Tableau 1.1
Propriétés physico-chimiques du Cd (Tiré de ATSDR, 1999)

| | |
|--------------------------|------------------------|
| Symbole chimique | Cd |
| Numéro atomique | 48 |
| Masse atomique | 112.4 g/mol |
| Densité | 8.64 g/cm ³ |
| Température de fusion | 321 °C |
| Température d'ébullition | 767 °C |

1.2 Les différentes utilisations du cadmium

Il n'existe aucun minerai de Cd en quantité suffisante pour être exploité. Généralement, le Cd est surtout obtenu comme sous-produit commercial du raffinage du Zn. Le concentré de Zn traité par les fonderies et les raffineries au Canada contient

habituellement de 0,1 à 0,3 % de Cd (MacLatchy, 1992). Le Cd peut aussi être récupéré à partir de produits en Cd recyclés ou de déchets industriels.

L'utilisation du Cd à l'échelle mondiale peut se regrouper en cinq grands domaines: les piles Ni-Cd (\approx 50 % de la consommation mondiale), les enduits (20 %), les pigments (18 %), les stabilisants dans les plastiques et les produits synthétiques (6 %) et les alliages (6 %) (Hoskin, 1991). On retrouve aussi de petites quantités de Cd dans les tubes cathodiques de téléviseurs, dans les fils de téléphone, les radiateurs d'automobile, les barres de commande et les blindages de réacteurs nucléaires, les huiles moteur et les agents de vulcanisation du caoutchouc (CCMRE, 1987). La consommation industrielle de Cd au Canada a augmenté de manière soutenue ces dernières années: 18,9 t en 1987, 20,0 t en 1988, 28,8 t en 1989 et 35,2 t en 1990 (Hoskin, 1991; Koren, 1992). La galvanoplastie représentait près de 60 à 77 % de la consommation totale canadienne entre 1987 et 1989, le reste ayant été utilisé dans la fabrication de métaux d'apport pour la soudure, d'alliages, de produits chimiques et de pigments (Hoskin, 1991).

Le Canada est le quatrième producteur mondial de Cd raffiné, sa production se chiffrant à 1 963 t en 1992 (Keating, 1993). La plus grande partie de la production canadienne provient de fonderies et de raffineries de métaux communs situées dans quatre provinces soit le Québec, la Colombie-Britannique, l'Ontario et le Manitoba (Énergie, Mines et Ressources Canada, 1991).

1.3 Pénétration et niveaux dans l'environnement

Le Cd est mobilisé dans l'environnement de façons naturelles principalement par transport éolien de particules provenant du sol, par les incendies de forêt et par les émissions volcaniques. À ce jour, il est toujours difficile de calculer la contribution des rejets naturels par rapport à celle des rejets d'origine anthropique. À l'échelle planétaire, il a été estimé que les émissions naturelles de Cd dans l'atmosphère sont d'environ 1 300 t par an (Nriagu, 1989). Il a aussi été estimé que les activités humaines rejetteraient dans l'atmosphère de 3 à 10 fois plus de Cd que les sources naturelles, soit de 3 100 à 12 000 t par année. De cette quantité 65 à 85 % proviennent de la fonte de minerais de métaux communs (Yeats et Bewers, 1987;

Nriagu et Pacyna, 1988), et 6 à 7 % proviendraient de l'usage de combustibles fossiles (Nriagu et Pacyna, 1988).

Le Cd ne subit pas de processus de dégradation dans l'environnement. Par contre, sa bioaccessibilité, sa mobilité et son temps de séjour peuvent subir l'influence de processus physiques ou chimiques. En effet, dans l'atmosphère, les différents composés du Cd, par exemple l'oxyde de Cd (CdO), sont surtout présents sous forme de particules dont les plus fines sont plus facilement bioaccessibles que les particules plus grosses. Dans les sols, la mobilité du Cd et son potentiel de bioaccumulation dans les systèmes biologiques augmentent lorsque le pH et la teneur en matières organiques sont faibles et lorsque la taille des particules et l'humidité sont élevées. En milieu aquatique, la bioaccessibilité du Cd devient plus importante quand la dureté, le pH, la concentration de matières en suspension et la salinité sont faibles et lorsque le potentiel d'oxydoréduction est élevé (Wagemann *et al.*, 1994).

Les composés de Cd qui sont émis dans l'air par des sources aux températures de plus de 600 °C s'oxydent rapidement en CdO (Nriagu, 1980). Pratiquement tout le Cd atmosphérique provenant de combustion s'associe à des particules fines inhalables ($< 10 \mu\text{m}$) et à des aérosols (ATSDR, 1993). La majorité du Cd rejeté dans l'atmosphère se dépose en 4 semaines ou moins, et ce, généralement dans un rayon de 1 000 km de la source d'émission (Bewers *et al.*, 1987).

1.3.1 Le cadmium dans l'air

Il existe peu d'information sur les processus de transformation du Cd dans l'atmosphère. On sait par contre que les composés principalement retrouvés dans l'atmosphère (l'oxyde, le chlorure et le sulfate) offrent une résistance à la dégradation photolytique (ATSDR, 1993). Le Cd est dissous dans la vapeur d'eau et est ensuite éliminé de l'atmosphère sous forme de dépôts humides (Fones et Nimmo, 1993).

Au Canada, les concentrations de Cd particulaire dans l'air varient selon la proximité de régions urbaines et industrielles. Elles sont comparables aux valeurs obtenues ailleurs sur la planète. Les concentrations moyennes de Cd inhalable (diamètre $\leq 10 \mu\text{m}$) dans 11 villes,

entre 1984 et 1989, varient de 1 ng/m³ entre Winnipeg et Ottawa, à 4 ng/m³ entre Windsor et Montréal, la valeur moyenne pour tous les endroits se situant à 2 ng/m³ (Environnement Canada, 1991).

1.3.2 Le cadmium dans les sols

Dans les sols, le pH est le facteur ayant une influence principale sur la mobilité du Cd (Chanmugathas et Bollag, 1987; Eriksson, 1989; Christensen, 1989; Lodenius et Autio, 1989). Dans des conditions acides (pH < 6.0), la mobilité du Cd est augmentée et il peut se produire un important déplacement de ce dernier dans les différents horizons pédologiques ainsi que vers d'autres milieux de l'environnement (Bergkvist, 1986; Bergkvist *et al.*, 1989; LaZerte *et al.*, 1989). La mobilité du Cd est limitée par son adsorption sur la matière organique avec laquelle il a la plus grande affinité (Blume et Brummer, 1991), l'argile ou les oxydes métalliques hydratés (Christensen, 1984, 1989; Eriksson, 1989). La mobilité du Cd est donc plus importante dans les sols sablonneux que dans les sols riches en matière organique.

1.3.3 Le cadmium dans l'eau

Normalement, l'adsorption du Cd sur les particules en suspension ainsi que la formation de précipités sont deux mécanismes permettant d'éliminer le Cd de la tranche d'eau (Stephenson et Mackie, 1988). La concentration de Cd dissous est plus élevée dans les lacs à pH acide (pH = 5.0 à 6.5) que dans les lacs ayant un pH plus neutre (Steinnes, 1990) car une diminution du pH favorise la solubilisation du Cd dans l'eau. Dans les lacs à pH neutre, le Cd précipité et adsorbé sur les particules est généralement transporté vers les sédiments de fonds (ATSDR, 1993). Suite à la décomposition des particules, le Cd est une nouvelle fois dissous et recyclé dans les eaux. Il peut par contre être fixé dans les sédiments anaérobiques sous forme de CdS. Parce qu'il ne forme aucun composé volatil, il ne peut y avoir d'échange entre l'eau et l'air (ATSDR, 1993). Ce sont donc des facteurs comme le pH, la concentration et la composition de matières en suspension ou le potentiel d'oxydoréduction qui vont déterminer ce qu'il adviendra du Cd dans les eaux douces.

Pour ce qui est des eaux marines, c'est surtout la concentration de matières en suspension et la salinité qui détermineront les proportions du Cd dissous et du Cd particulaire. En présence d'une plus grande salinité, on observe une augmentation de la proportion des formes solubles de chlorure de Cd (ex CdCl , CdCl_2 , CdCl_3^-) (Bewers *et al.*, 1987). La plus grande partie du Cd particulaire (~95 %) pénétrant dans le milieu marin par ruissellement est retenue dans les estuaires tandis que de 60 à 85 % de la forme dissoute du Cd est susceptible de pénétrer dans les milieux pélagiques (Bewers *et al.*, 1987; Lum, 1987).

1.3.4 Le cadmium dans les aliments

Mis à part les vapeurs, c'est donc via la chaîne alimentaire que la majorité de la population est exposée au Cd. En effet, le Cd présent dans l'air et dans l'eau contamine les sols agricoles (MacLachy, 1992) et au Canada, la plupart des aliments produits contiennent du Cd. En 1985, une étude a démontré que les fruits de mer et les croustilles étaient les aliments contenant les plus hautes concentrations de Cd avec une moyenne de 100 ng/g de poids frais (Friberg *et al.*, 1985). Les concentrations moyennes étaient supérieures à 20 ng/g dans les abats, la plus grande concentration se retrouvant dans le foie et les reins des animaux. La viande, les poissons et les fruits peuvent contenir de 1 à 50 µg/kg. En Amérique du Nord, l'absorption quotidienne de Cd via l'air, l'eau et la nourriture serait de 10 à 50 µg par jour (Casarett, Klaassen et Watkins, 2003).

CHAPITRE II

LE CADMIUM DANS LES SYSTÈMES BIOLOGIQUES

Notre environnement comporte plusieurs espèces chimiques de Cd provenant de sources naturelles ou anthropiques. Comme nous l'avons vu au chapitre précédent, le Cd est présent dans l'air, l'eau, la terre et dans la nourriture que nous consommons. Il est important de bien comprendre comment se fait l'absorption du Cd et ce qu'il en advient une fois dans l'organisme.

2.1 Toxicocinétique

2.1.1 Absorption

Chez l'humain, le Cd est absorbé majoritairement par inhalation ou par ingestion. Il est aussi possible qu'il puisse, tout comme chez le cobaye et la grenouille, être absorbé de façon minime par contact cutané (Wahlberg, 1965, Vasil'eva *et al.*, 1987).

Par voie pulmonaire, une fraction du Cd se dépose le long du tractus respiratoire en fonction de la taille des particules. Ensuite selon l'hydrosolubilité, les sels les plus solubles (chlorures) vont être absorbés à environ 90 % alors que les sulfures le seront à environ 10 % (INERIS, 2005). Suite à l'ingestion, la biodisponibilité orale du Cd est relativement peu importante ($\leq 5\%$ du Cd ingéré, Elinder, 1992) si on la compare à la biodisponibilité pulmonaire du Cd inhalé (25 - 60%). Plusieurs facteurs peuvent influencer l'absorption du Cd. Par exemple, une déficience alimentaire en calcium ou en fer et une diète pauvre en protéine peuvent en favoriser l'absorption (ATSDR, 1999). Ceci sera plus longuement détaillé au chapitre IV.

2.1.2 Distribution

Une fois absorbé, le Cd peut se lier aux érythrocytes ou à des protéines plasmatiques comme la métallothionéine (MT) avec laquelle il a une affinité pour les résidus cystéine ou avec l'albumine (Alb) présentant un groupement –SH libre (Goumakos *et al.*, 1991; Reichl et Benecke, 2004). Le Cd une fois lié va ensuite être transporté vers le foie et les reins, ces derniers étant le site majeur d'accumulation à long terme.

Le Cd ne subit pas de transformation chimique directe comme l'oxydation, la réduction ou l'alkylation. Il se lie plutôt aux groupements anioniques de certaines protéines (spécialement l'Alb et la MT). Il a une interaction particulière avec la MT qui a la possibilité de lier jusqu'à 7 atomes de Cd par molécule. De plus, la MT est inducible par le Cd, le Zn ainsi que d'autres métaux mais aussi par une variété de composés organiques ainsi que par certains stress physiologiques (Waalkes et Goering 1990).

2.3.3 Excrétion

Parce que seulement une faible partie du Cd présent dans le tractus gastro-intestinal est absorbée, la plupart de la dose ingérée se retrouve dans les selles. Par contre, une fois absorbé et distribué dans l'organisme, l'excrétion rénale est comparable à l'élimination par les selles (ATSDR, 1999). Il est toutefois important de souligner que ce qui est éliminé par les selles provient de l'excrétion biliaire et, possiblement, de l'excrétion par l'épithélium intestinal comme tel mais les données obtenues à ce jour ne permettent pas de distinguer entre les deux. Ce point est au cœur même du sujet de notre étude. Si les mesures sont faites sur un court laps de temps, il se peut aussi que les selles contiennent du Cd non absorbé; on ne peut alors parler d'excrétion. Mentionnons enfin que la demi-vie du Cd dans le corps humain est d'environ 30 ans (Pinot *et al.*, 2000). Ainsi, malgré que son absorption orale soit faible, elle demeure fort préoccupante.

2.2 Toxicité

2.2.1 Impact de la spéciation sur la biodisponibilité et la toxicité

La spéciation du Cd a un impact important sur la biodisponibilité de ce dernier. En effet, le Cd sous forme de Cd^{2+} est hautement susceptible d'être absorbé dans l'intestin. C'est par mimétisme ionique que le Cd compétitionne avec les métaux essentiels pour certains transporteurs. En effet, des études d'Elisma et Jumarie (2001) ont démontrées que le Cd était transporté par un transporteur de Fe, NRamp2, du côté luminal de l'entérocyte. La spéciation du Cd peut aussi affecter sa toxicité en ayant un impact sur sa réactivité avec d'autres molécules. Le Cd à l'état élémentaire n'est pas toxique pour les organismes vivants mais il le devient après transformation chimique une fois sous forme de Cd^{2+} . Le Cd sous forme cationique peut interagir avec plusieurs ligands donneurs d'électrons en modifiant leur structure ou inhibant leurs activités biologiques.

2.2.2 Toxicité aiguë

Une intoxication aiguë peut être le résultat de l'ingestion d'une concentration importante de Cd provenant de boissons ou de nourritures contaminées. En effet, il a été rapporté que l'ingestion de boissons contenant une concentration de 16 mg/L causait des nausées, des vomissements et des douleurs abdominales importantes (Nordberg, *et al.*, 1985).

Une exposition à des vapeurs contenant du Cd est aussi susceptible de causer une toxicité aiguë. Des études démontrent aussi qu'une inhalation aiguë de Cd peut causer la mort chez les animaux de même que chez l'humain. Plusieurs cas d'expositions aiguës accidentelles et mortelles ont été rapportées chez l'humain. Pendant ces expositions aiguës, les symptômes initiaux relativement faibles durant quelques jours sont suivis d'œdème pulmonaire sévère et de pneumonie menant au décès causé par un arrêt respiratoire (Beton *et al.*, 1966; Lucas *et al.*, 1980; Patwardhan et Finckh 1976; Seidal *et al.*, 1993).

2.2.3 Toxicité chronique

De façon réaliste, c'est suite à des expositions répétées à de faibles doses que la population générale risque d'être affectée par la toxicité du Cd. Les effets d'une exposition chronique sur différents organes seront détaillés ci-dessous.

2.2.3.1 Les os

Le Cd entraîne un dérèglement du métabolisme du Ca (Buchet *et al.*, 1990). Ce dérèglement peut mener à des troubles de la masse osseuse comme l'ostéomalacie ou l'ostéoporose. La maladie Itai-Itai, décrite initialement au Japon en 1967, entraîne des perturbations du métabolisme du Ca avec apparition d'une décalcification osseuse entraînant de troubles ostéomalacie, d'insuffisance rénale, de douleurs osseuses et de fractures. Cette maladie est due à une ingestion de riz contaminé par du Cd ayant été déversé en amont dans les cours d'eau irriguant les rizières.

Des études sur des animaux de laboratoire indiquent que les sujets plus jeunes sont plus susceptibles que les adultes à subir une perte de la masse osseuse suite à une exposition orale au Cd. Ces études démontrent aussi que plus la diète est pauvre en Ca, en protéines, en Fe ou en gras, plus l'absorption de Cd sera importante (Schafer *et al.* 1986; Jaeger, 1990; Reeves et Chaney 2001, 2002). Les enfants ayant une diète pauvre en Fe, Ca ou protéines sont donc probablement susceptibles d'absorber plus de Cd que les adultes (ATSDR, 1999).

2.2.3.2 Les poumons

Une exposition aiguë à de très grandes concentrations de Cd peut résulter en des dommages pulmonaires importants tandis que l'inhalation chronique de plus faibles niveaux de Cd sur une longue période de temps résulte en une accumulation au niveau des reins et potentiellement à une maladie rénale ou en des maladies pulmonaires chroniques comme l'emphysème et la bronchite.

2.2.3.3 Les reins

La toxicité du Cd lié à la MT serait moins importante que celle du Cd non lié. En effet, des études menées sur des souris n'exprimant pas la MT ont démontré la présence de lésions rénales nettement plus sévères que chez les souris témoins (Liu *et al.*, 1998). La MT est donc une protéine intracellulaire qui a un rôle double lors d'intoxications chroniques au Cd. Elle diminue généralement la toxicité du Cd et d'autres métaux en liant les cations métalliques électrophiles qui autrement interagiraient avec des molécules cibles par des attaques nucléophiles. Par ailleurs, le Cd lié à la métallothionéine (Cd-MT) dans la circulation sanguine est filtré au niveau des glomérules et réabsorbé dans les tubules proximaux. Dans les cellules tubulaires, la MT est dégradée par les lysosomes et le Cd est libéré (Squibb *et al.*, 1984). La synthèse de MT dans les cellules tubulaires est stimulée par le Cd présent dans le cortex rénal mais quand celui-ci atteint des niveaux supérieurs à 200 µg/g, la synthèse de MT ne suffit plus et les niveaux de Cd non lié sont suffisamment hauts pour causer des dommages tubulaires (Staessens *et al.*, 1984).

Le premier signe de lésions rénales causées par le Cd est habituellement une dysfonction tubulaire mise en évidence par l'augmentation de l'excrétion de protéines ayant un faible poids moléculaire dont la β 2-microglobuline, l' α -microglobuline et la *N*-acétylglucosaminidase (Thevenod, 2003). Normalement ces protéines sont d'abord filtrées par le glomérule et ensuite réabsorbées dans les tubules proximaux. Leur excrétion dans l'urine est donc un indicateur de lésions au niveau des tubules proximaux. Il est possible que la protéinurie tubulaire soit suivie par d'autres signes de dysfonction rénale, tels que la protéinurie glomérulaire se traduisant par une excrétion urinaire de protéines de masse moléculaire plus élevée (ex : l'Alb) probablement due à des lésions glomérulaires, une augmentation de l'excrétion de glucose dans l'urine, d'acides aminés, de phosphore, de calcium et d'acide urique ainsi qu'une réduction de la capacité de concentration des reins mais qui pourraient aussi être causées par une insuffisance rénale tubulaire.

Il a été démontré que des travailleurs exposés au Cd finissent par développer un faible taux de filtration glomérulaire (Bernard *et al.*, 1992; Järup *et al.*, 1995). Bien qu'il ait été suggéré que les dommages pourraient être réversibles (Hotz *et al.*, 1999), de nombreuses

données suggèrent que les dommages seraient plutôt irréversibles (Järup *et al.*, 1995; Jarup 2002).

2.2.3.4 Le cœur

À notre connaissance, il n'existe à ce jour aucune étude fiable démontrant qu'une exposition à des vapeurs de Cd pourrait avoir des effets néfastes au niveau cardiovasculaire chez l'humain. Chez le rat, Kutzman *et al.*, (1986), ont démontré une augmentation significative du poids du cœur suite à une exposition par inhalation à 1.06 mg Cd/m³ de CdCl₂ pendant 62 jours, 5 jours par semaine à raison de 6 heures par jour. Le poids corporel de ces rats était aussi significativement réduit suite à cette exposition.

2.2.3.5 Le système nerveux

Des études épidémiologiques chez l'humain suggèrent qu'il existerait un lien entre un comportement anormal et/ou une diminution de l'intelligence chez les enfants et les adultes exposés au Cd. Il faut par contre être prudent sur les conclusions car les sujets de ces études ont possiblement été en contact avec d'autres métaux toxiques (Klassen, 2001). De plus, la barrière hémato-encéphalique et les cellules épithéliales circumventriculaires possédant des jonctions serrées limitent l'entrée du Cd au niveau du système nerveux central. Il se pourrait toutefois que le Cd comme le Hg puisse pénétrer la barrière hémato-encéphalique par mimétisme moléculaire (Ballatori, 2002).

2.2.3.6 Le foie

Des études menées sur des travailleurs exposés au Cd par inhalation n'ont démontré aucun effet nocif au niveau du foie (Adams *et al.* 1969; Bonnell 1955). Par contre, certains effets ont été retrouvés occasionnellement chez le rat exposé par inhalation à 0.1 mg/m³ de chlorure de Cd sur des périodes allant de 6 à 30 jours. Par exemple, une augmentation du poids du foie a été notée par Kutzman *et al.* (1986) et Glaser *et al.* (1986) ont dénoté une augmentation sérique de l'activité de l'alanine aminotransferase, un indicateur fréquent de dommages au foie. La résistance du foie à

la toxicité du Cd est probablement due à sa capacité à produire la méthallothionéine pouvant lier le Cd et ainsi réduire la concentration d'ions libres Cd^{2+} .

2.2.3.7 Cancérogénicité et génotoxicité du cadmium

Des études effectuées auprès de travailleurs exposés quotidiennement au Cd dans l'air n'ont pas mené à des résultats concluants sur la capacité du Cd à causer le cancer du poumon chez l'humain. Plusieurs études épidémiologiques chez des travailleurs ont été menées dans le but de déterminer s'il existait un lien entre l'exposition par inhalation de Cd et le risque de développer un cancer et ce particulièrement au niveau des poumons. De façon générale, les données recueillies démontrent qu'il existerait un accroissement des risques de développer un cancer du poumon suite à une exposition prolongée au Cd. Malheureusement, les données provenant de certaines études peuvent avoir été mal interprétées à cause de la présence de nombreux facteurs confondant tels que la présence d'autres métaux cancérogènes ou l'exposition à la fumée de cigarette (ATSDR, 1999). Certaines études indiquent une augmentation du taux de cancer de la prostate chez des travailleurs exposés au Cd (Kipling et Waterhouse 1967; Kjellstrom *et al.*, 1979; Lemen *et al.*, 1976). Par contre, des études subséquentes n'ont démontré aucune augmentation significative du taux de cancer de la prostate (Kazantzis *et al.*, 1988; Sorahan 1987; Thun *et al.*, 1985).

Aucune étude récente ne concerne la cancérogenèse du Cd suite à une exposition orale chez l'humain. Les résultats d'études épidémiologiques obtenus au cours des années 80 ne démontrent aucun résultat significatif (Inskip et Beral 1982; Lauwerys et De Wals 1981).

Malgré ces résultats contradictoires et à lumière des résultats obtenus chez l'animal, les composés inorganiques du Cd ont été classés comme des substances possiblement cancérogènes pour l'être humain (Gouvernement du Canada/Environnement Canada/Santé Canada, 1994). On entend par là qu'il existe des risques d'effets néfastes sur la santé humaine, et ce, quel que soit le niveau d'exposition. Le Cd est donc classé cancérogène de type I depuis 1993 (United Nations, WHO, IARC, 1993).

Une partie des effets nocifs du Cd sont dus à la production d'espèces d'oxygène réactives (ROS) pouvant être responsables de dommages sur une variété de molécules

biologiques (Wang *et al.*, 2004) dont l'ADN. Bien que la toxicité du Cd soit liée à une augmentation des niveaux de ROS, le Cd ne les induit pas directement par des réactions de Harber-Weiss et/ou de Fenton contrairement à certains autres métaux lourds. Il peut néanmoins les favoriser en augmentant les niveaux de Fe libre, métal bien connu pour son implication dans les réactions de type Fenton à l'origine de la production de ROS dont le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).

Le développement d'un organisme, la taille de ses organes et de ses tissus est directement lié à un programme génétique spécifique à chaque espèce et à des signaux environnementaux influençant la cellule à demeurer quiescentes, à se différencier, à entrer en apoptose ou à se diviser. Les effets nocifs du Cd sur la croissance et la reproduction des animaux suggèrent que le Cd interfère aussi avec des mécanismes responsables de moduler la division cellulaire (Waisberg *et al.*, 2003; Sobkowiak et Deckert 2003, 2004).

CHAPITRE III

PHYSIOLOGIE INTESTINALE

3.1 Physiologie intestinale

L'intestin grêle est la partie de l'appareil digestif située entre l'estomac et le côlon. Il comprend un segment fixe, le duodénum, suivi de deux segments mobiles, le jéjunum puis l'iléon.

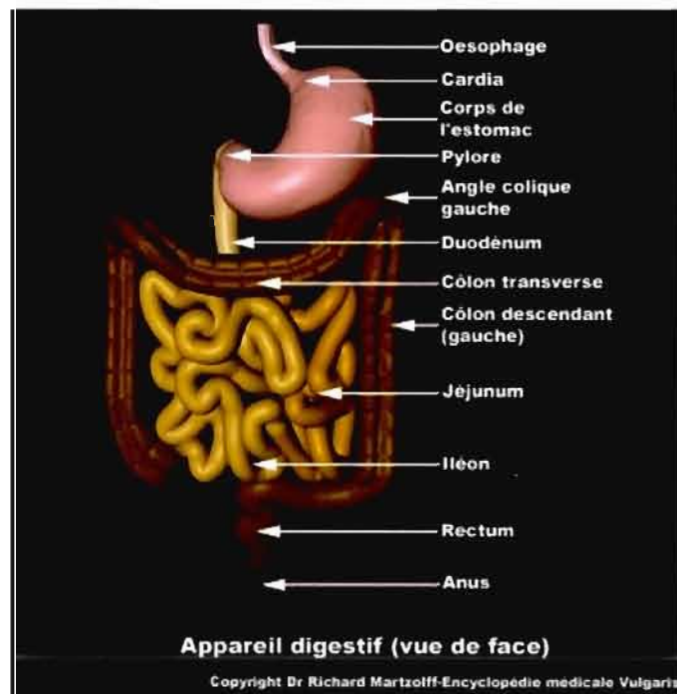


Figure 3. I - Représentation de l'appareil digestif humain
(Tirée de vulgaris medical 2008)

L'intestin grêle est composé de quatre couches de tissus concentriques. La couche extérieure (en contact avec la lumière intestinale) est la muqueuse qui repose sur la *muscularis mucosae* et comprend l'épithélium et la *lamina propria*. Elle est suivie de la sous-muqueuse qui est une couche de tissus conjonctifs supportant la muqueuse où l'on retrouve des vaisseaux sanguins et lymphatiques. Viens ensuite la musculature avec sa couche longitudinale externe et la couche circulaire interne de fibres musculaires lisses. On retrouve finalement, la couche séreuse qui n'est autre que le feuillet viscéral du péritoine (Marieb, 1999).

Le rôle principal de l'intestin grêle est d'absorber les nutriments, il est donc aussi susceptible d'absorber certaines substances toxiques pouvant être présentes dans la nourriture. Il joue aussi un rôle dans l'élimination de certaines substances ayant été inactivées par le foie, sécrétées dans la bile et dès lors, éliminées dans les fèces. Il est aussi possible que certaines substances en circulation dans le sang puissent être transportées du côté basolatéral (BL) de l'entérocyte (côté du sang) et être plus ou moins efficacement expulsées du côté apical (AP) dans la lumière intestinale. Ce rôle de l'épithélium intestinal dans l'excrétion de substances toxiques demeure cependant peu étudié. Nous y reviendrons au chapitre V.

L'intestin grêle est très bien adapté à sa fonction d'absorption. Sa longueur représente déjà une très grande surface d'absorption et ses parois ont subies trois modifications structurales accroissant encore plus la surface d'absorption : les plis circulaires, les villosités et les microvillosités. Grâce à ces modifications, la surface d'absorption est évaluée à 200 m².

L'épithélium intestinal fait partie de la muqueuse de la paroi intestinale. L'épithélium intestinal est renouvelé tous les 4 à 6 jours, les cellules prolifératives de la crypte se divisent et la différenciation cellulaire a lieu lors de la migration le long de l'axe crypte-villosité. Une fois arrivé au sommet de la villosité, l'entérocyte a subi des changements au niveau de sa structure et est maintenant polarisé (Fig. 3.2). L'épithélium intestinal est formé d'une seule couche de cellules, reliées les unes aux autres par des jonctions serrées situées au bord de leur surface apicale. L'épithélium est aussi composé de cellules caliciformes dont le rôle est de sécréter du mucus dans la lumière intestinale ainsi que de cellules endocrines qui libèrent des

hormones dans le sang (Marieb, 1999). Les cellules de Paneth responsables de la sécrétion de facteurs de croissance se trouvent aux creux des cryptes (Quaroni 1985; Karam, 1999).

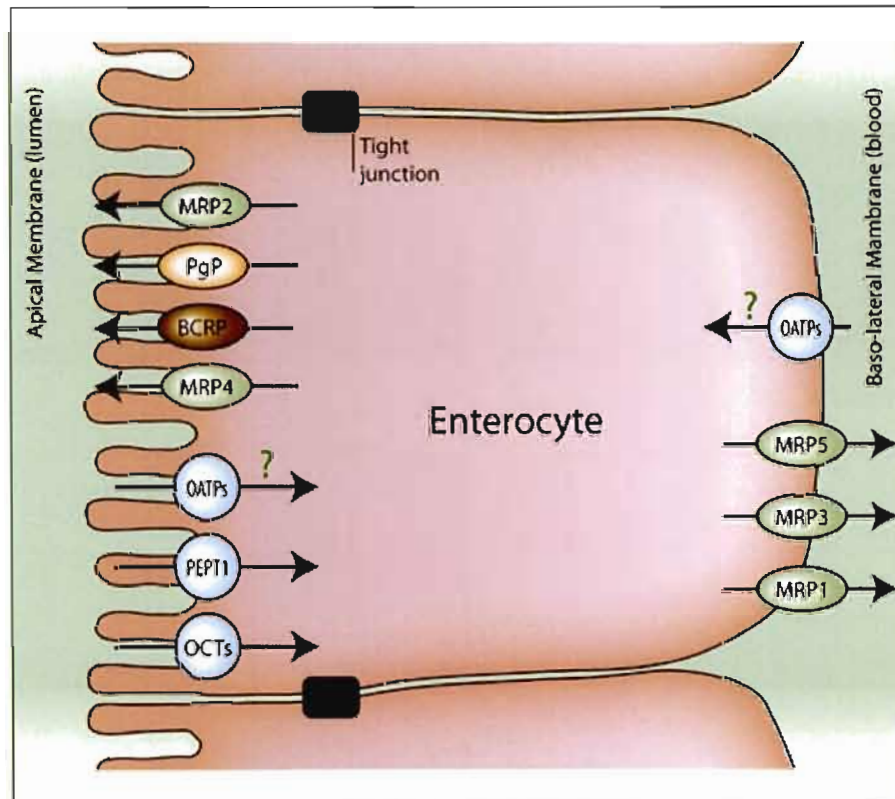


Figure 3. 2 - Entérocyte polarisé caractérisé par des microvillosités du côté apical. On observe la présence de différents transporteurs d'efflux et d'influx aux membranes AP et BL. (Tiré de <http://www.solvobiotech.com>)

Mais l'entérocyte mature n'a pas subi que des changements morphologiques, le processus de différenciation entérocytaire entraîne aussi l'acquisition de nouvelles fonctions. Diverses enzymes nécessaires à la digestion sont alors exprimées par l'entérocyte : lactase, sucrase et maltase participent à la digestion des glucides tandis que les aminopeptidases, carboxypeptidase et dipeptidases se chargent de la digestion des polypeptides (Marieb, 1999). Ces enzymes sont exclusivement exprimées du côté AP de la membrane qui développe de

nombreuses microvillosités qui lui valent le nom de membrane en bordure en brosse. Des protéines nécessaires à l'absorption sont aussi exprimées au cours de la différenciation de l'entérocyte : les transporteurs SGLT réalisant un symport Na^+ /glucose, les transporteurs GLUT responsables du transport facilité de glucose et le transporteur NRAMP2 responsables du transport de Fe.

Une fois à l'apex de la villosité, les cellules seront remplacées par de nouvelles cellules remontant l'axe crypte-villosité. Ce renouvellement par exfoliation implique l'anoikis, un processus apoptotique déclenché suite à la perte de contact de la cellule avec la matrice extracellulaire.

3.2 Modèles cellulaires

Les études *in vitro* peuvent être faites sur des cultures primaires ou sur des lignées cellulaires. Les cultures primaires sont des cellules non transformées provenant directement de tissus d'animaux. L'utilisation de cultures primaires demande donc de procéder régulièrement à des vivisections nécessitant une méthodologie complexe et durant lesquelles les cellules prélevées peuvent être affectées par plusieurs facteurs.

Une lignée cellulaire est une population de cellules ayant en théorie la capacité illimitée de se diviser. Il est donc possible de les cultiver en laboratoire. Ce sont généralement des cellules cancéreuses prélevées chez un patient et ayant subi une transformation par un oncogène ou des cellules rendues artificiellement immortelles par manipulation génétique expérimentale. Les lignées cellulaires présentent donc le désavantage de posséder des caractéristiques de cellules cancéreuses, ce qui limite l'extrapolation des résultats obtenus aux cellules normales *in situ*.

3.2.1 Le modèle Caco-2

Afin de travailler *in vitro* sur la problématique d'absorption intestinale du Cd, il est primordial de choisir un d'épithélium cellulaire similaire à celui retrouvé dans l'intestin humain. Un des modèles utilisés dans le cadre de ce projet est le modèle cellulaire Caco-2. Les cellules Caco-2 représentent une lignée cellulaire tumorale isolée à partir d'un

adénocarcinome colorectal présent chez un homme caucasien de 72 ans (Fogh *et al.*, 1977). Ce modèle est beaucoup utilisé pour étudier les fonctions intestinales ainsi que l'absorption des xénobiotiques. Nombreux sont les avantages de la lignée cellulaire Caco-2 utilisée comme modèle *in vitro*. En effet, elles présentent, tout comme les entérocytes matures, une membrane AP en bordure en brosse ainsi que des jonctions serrées lorsqu'elles sont différenciées (Fig. 3.3).

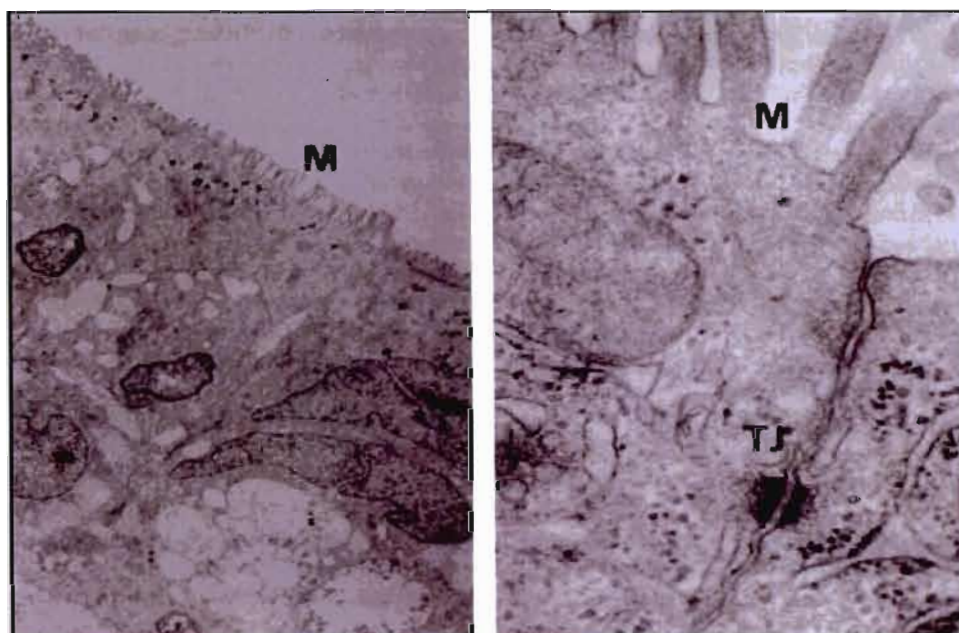


Figure 3. 3 - Image obtenue par transmission d'électrons d'une cellule Caco-2 après sa différenciation. Les microvillosités (M) et les jonctions serrées (TJ) sont bien visibles. (Tiré de Pranav *et al.*, 2006)

La différenciation des cellules Caco-2 a lieu spontanément aussitôt la confluence atteinte. Cette différenciation, lorsque les cellules sontensemencées à une densité de 12×10^3 cellules/cm², débute après environ 7 jours de culture et se poursuit de sorte que les cellules sont différenciées de façon hétérogène deux semaines post-confluence, puis de façon plus homogène jusqu'à quatre semaines post-confluence (Vachon et Beaulieu, 1992). Une fois bien différenciées, les monocouches cellulaires ont tendance à former des dômes démontrant ainsi leur capacité à transporter des ions et de l'eau du côté AP vers le côté BL ce qui révèle une polarité fonctionnelle. De plus, les cellules Caco-2 expriment à leur surface des protéines pour le transport de nutriments comparables à celles retrouvées dans les

entérocytes humains différenciés. En effet, elles présentent des systèmes de transport de glucose dépendants et indépendants du Na^+ SGLT et GLUT (Blais *et al.*, 1987). Elles expriment aussi des systèmes de transport pour les acides aminés, les dipeptides ou tripeptides, couplés au H^+ (Inui *et al.*, 1992; Thwaites *et al.*, 1993). Finalement, elles expriment des enzymes retrouvées dans les entérocytes comme par exemple la γ -glutamyltranspeptidase, l'aminopeptidase N et la sucrase-isomaltase, la dernière étant spécifique à l'entérocyte (Jumarie et Malo, 1991).

3.2.2 TC7, un clone de Caco-2

Le deuxième modèle cellulaire ayant été utilisé lors du présent projet est un clone de Caco-2 présentant un haut degré de différenciation. Après avoir analysé des cultures post-confluentes, Mahrahoui *et al.*, (1994) n'ont trouvé aucune différence entre les cellules TC7 et les Caco-2 tant au niveau de la polarité cellulaire qu'au niveau de la présence du côté AP de villine, d'aminopeptidase N et de phosphatase alcaline. Une importante différence a par contre été démontrée au niveau du taux de consommation de glucose et au niveau de l'expression de la sucrase-isomaltase, beaucoup plus fortement exprimée dans le clone TC7. Cette importante distinction, ajoutée à d'autres caractéristiques morphologiques et biochimiques, permettait aux auteurs de qualifier les cellules TC7 comme clone hautement différencié de la lignée cellulaires Caco-2 (Mahrahoui *et al.*, 1994).

CHAPITRE IV

TRANSPORT MEMBRANAIRE DE CADMIUM

La bicouche lipidique de la membrane plasmique permet à la cellule de maintenir une concentration de soluté différente de chaque côté de la membrane. Toutefois, cette compartimentation n'est pas absolue. Un échange moléculaire doit être possible afin de répondre aux besoins métaboliques de la cellule. Il existe donc différents mécanismes de transport de molécules et d'ions impliquant des transporteurs, des canaux ou des pompes.

Le passage des métaux au travers de la membrane plasmique peut se faire de différentes façons soit par diffusion simple, par des transporteurs ou par endocytose. Au niveau de l'épithélium intestinal, le transport des métaux ne serait pas lié à du transport actif mais plutôt à du transport passif impliquant une diffusion simple ou de la diffusion facilitée permettant la diffusion uniquement selon un gradient de concentration (Schoenmakers *et al.*, 1992).

Parce qu'il existe une similarité entre les métaux du groupe IIB et entre les métaux du groupe IIB et ceux du groupe IIA, il existe des interactions entre les métaux essentiels (Ca, Zn, Fe) et les métaux toxiques (Cd, Hg) pour certains systèmes de transport.

4.1 Interactions entre le cadmium et le calcium

Plusieurs études démontrent qu'il existe une importante interaction entre le Cd et le Ca. Nogawa *et al.*, (1987; 1990) ont démontré que lors d'expositions au Cd, on observe des troubles au niveau des reins et plus précisément au niveau du métabolisme de la vitamine D en sa forme biologiquement active. Buchet *et al.*, (1990) démontrent une augmentation de l'excrétion urinaire de Ca chez les individus exposés au Cd. Ces résultats suggèrent que les troubles osseux observés lors d'intoxications au Cd résulteraient d'une diminution de

l'activation de la vitamine D menant à un déséquilibre de l'absorption et de l'excrétion du Ca. Plusieurs études démontrent aussi qu'une diète pauvre en Ca mène à une absorption intestinale plus importante de Cd (Itokawa *et al.*, 1974; Kimura *et al.*, 1974; Larsson et Piscator 1971; Wang et Bhattacharyya 1993; Wang *et al.*, 2004). Cela suggère une implication des systèmes de transport du Ca, possiblement des canaux ioniques, dans l'accumulation cellulaire de Cd. Les travaux de Blazka et Shaikh (1991) ont pu démontrer qu'en présence de plusieurs bloqueurs de canaux calciques soit le diltiazem, la vérapamil, la nifedipine et la nitrendipine, on observait une diminution de l'accumulation de Cd.

4.2 Interactions entre le cadmium et le fer

En plus d'avoir des interactions avec le Ca, le Cd peut aussi en avoir avec le Fe. En effet, des études de Petering *et al.*, (1979) ont démontré que le Cd peut altérer le métabolisme du Fe. De plus, plusieurs études démontrent que chez le rat, une exposition orale au Cd réduit significativement l'absorption du Fe contenu dans la diète des animaux (Kelman *et al.*, 1978; Hays et Margaretten 1985; Sakata *et al.*, 1988). Il est aussi vrai qu'une carence ou qu'une diète pauvre en Fe peut causer une augmentation de l'absorption du Cd (Flanagan *et al.*, 1978; Schafer *et al.*, 1990). Cette augmentation peut s'expliquer par une interaction entre le Cd et le Fe pour les mêmes transporteurs. Elisma et Jumarie (2001) ont aussi démontré que DMT1, normalement responsable de l'absorption de Fe^{2+} , transporte aussi le Cd^{2+} de façon compétitive possiblement par mimétisme ionique. Ils ont démontré que la présence de Fe inhibait le transport de Cd. Bannon *et al.*, (2003), sont aussi arrivés à la même conclusion en utilisant des rats *knock out* DMT1.

4.3 Interactions entre le cadmium et le zinc

Le Zn tout comme le Ca ou le Fe est un métal essentiel au bon fonctionnement de l'organisme. Le Zn est donc normalement transporté à travers l'épithélium intestinal. C'est par mimétisme ionique que le Cd prend la place du Zn au niveau de certains transporteurs membranaires comme par exemple le transporteur ZIP8, un membre de la famille SLC39 (Dalton *et al.*, 2004). La toxicité du Cd est souvent due à une perturbation du métabolisme du Zn (Petering *et al.*, 1979). Le Cd est aussi susceptible de perturber certaines activités

enzymatiques comme par exemple la superoxyde dismutase (Cu/Zn-SOD) qui protège normalement contre les radicaux libres en catalysant la dismutation du superoxyde en oxygène et en peroxyde d'hydrogène (Omu et Fernandez, 2001). En ajoutant du Zn en supplément dans la diète, Flanagan *et al.* (1978) ont observé une diminution de l'absorption orale de Cd chez l'humain. Aussi, le Zn compétitionne avec le Cd pour les sites de liaison sur les enzymes, il est donc susceptible de diminuer les effets adverses du Cd. De plus, le Zn induit la formation de métallothionéine (Gunn *et al.*, 1968; Natuse et Hayashi 1989) qui, comme nous l'avons vu au chapitre II, lie le Cd, le rendant ainsi moins disponible pour exercer sa toxicité.

4.4 Impact de la spéciation sur le transport membranaire

Il est essentiel d'insister sur l'importance des différentes caractéristiques propres aux métaux dans les systèmes biologiques car ne pas tenir compte de ces caractéristiques peut mener à tirer des conclusions invalides sur le transport des métaux lourds à travers la membrane. L'impact de la spéciation sur le transport des métaux lourds en est une. Les métaux lourds, tels que le Cd, possèdent une grande affinité pour tout ligand susceptible de donner ou de partager un ou plusieurs électrons. Il est donc très peu probable que le Cd existe sous forme ionique dans les systèmes biologiques. Il existe plutôt sous diverses formes de complexes. *In vitro*, il est possible d'exposer les cellules dans des milieux dont la composition est définie et dans lesquels la spéciation du Cd est bien connue. Ainsi, le transport de Cd à travers la membrane peut être étudié en fonction de sa spéciation. Le transport de Cd sous différentes formes chimiques aura donc différentes caractéristiques.

4.5 Transporteurs membranaires

4.5.1 Superfamille des transporteurs ABC

L'atteinte toxique est un problème majeur pour les organismes vivants et les transporteurs de type *ATP binding cassette* (ABC) constituent un mécanisme de protection avantageux envers certains composés. En plus de jouer un rôle de protection contre les xénobiotiques en les pompant activement hors de la cellule, certains transporteurs ABC comme MDR1 sont surexprimés en présence de xénobiotiques. Plus leur expression est

importante, plus l'efflux le sera. Les transporteurs ABC sont présents dans tout le règne vivant et ils sont très conservés tant au niveau de leur séquence génétique qu'au niveau de leur organisation structurale. Ils possèdent une structure à quatre domaines dont deux transmembranaires servant de sites de reconnaissance du substrat et deux domaines cytoplasmiques impliqués dans l'hydrolyse de l'ATP. Le rôle de l'ATP est de servir de source d'énergie pour le transport d'une importante variété de substrats allant de simples ions à des macromolécules. Les transporteurs ABC des procaryotes comprennent des systèmes d'export et d'import tandis que les eucaryotes ne possèdent que des systèmes d'export (Mourez *et al.*, 2000). Ils se subdivisent en deux grandes familles, les transporteurs MRP (*multidrug-resistance proteins*) et les transporteurs MDR (*multidrug resistance*).

4.5.1.1 Les transporteurs MRP

La famille des transporteurs MRP regroupe au moins 6 membres dont la nomenclature varie. En effet, certains transporteurs MRP peuvent avoir jusqu'à 4 noms différents (Tableau 4.1).

Tableau 4.1
Résumé des transporteurs MRP ainsi que de leur différente nomenclature utilisée dans la littérature. Tiré de Borst *et al.*, 1999.

| Famille des MRP chez les mammifères | | | | |
|-------------------------------------|---------|----------|-----------|--------------|
| MRP1 = | ABCC1 = | MRP | | |
| MRP2 = | ABCC2 = | cMOAT = | cMRP= | EBCR (lapin) |
| MRP3 = | ABCC3 = | MOAT-D = | cMOAT-2 = | MLP-2 |
| MRP4 = | ABCC4 = | MOAT-B | | |
| MRP5 = | ABCC5 = | MOAT-C = | MOAT-C = | pABC11 |
| MRP6 = | ABCC6 = | MLP-1 = | ARA | |
| MRP7 = | ABCC10 | | | |

À l'intérieur de cette famille, la plus grande homologie au niveau de la séquence d'acides aminés se situe entre les transporteurs MRP1, -2, -3 et -6. Ils partagent aussi une

structure semblable et sont caractérisés par la présence, du côté N-terminal, d'une extension avec 5 régions transmembranaires correspondant au domaine transmembranaire zéro (TMD₀) de la glycoprotéine-P, ainsi que par un lien cytoplasmique (L₀), (Fig. 4.1).

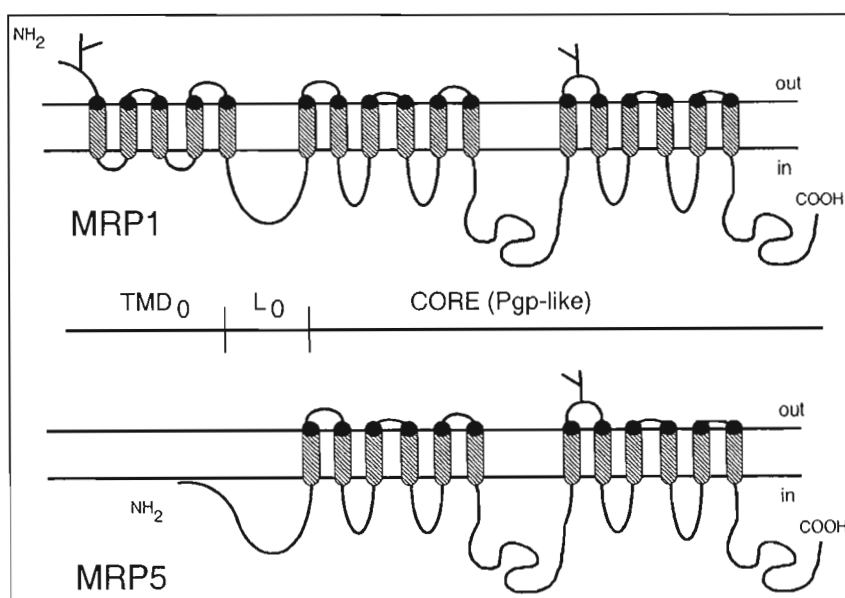


Figure 4. 1 – Structure secondaire des transporteurs MRP1 et MRP5 tiré de Borst *et al.*, 1999.

Selon l'isoforme, ils sont exprimés soit à la membrane AP, soit à la membrane BL. Ils ont comme rôle de transporter des conjugués anioniques comme par exemple des conjugués au glutathion (GSH). Les transporteurs MRP1, MRP4 et MRP5 semblent être distribués à peu près partout dans l'organisme tandis que les MRP2, MRP3 et MRP6 se retrouvent surtout dans le foie, les reins et l'intestin. Dans les cellules polarisées formant une couche simple, MRP2 est situé du côté AP de la cellule tandis que MRP1, MRP3 et MRP5 sont situés du côté BL comme l'indique la figure 4.2. Quant à la localisation de MRP6, il semble que l'on puisse le retrouver autant du côté AP que du côté BL. En effet, une étude de Madon *et al.*, (2000), a démontré que chez le rat, le transporteur MRP6 se retrouvait du côté AP des hépatocytes. Une autre étude réalisée par Aleksunes, Cui et Klaassen (2008) a démontré qu'il se retrouvait plutôt du côté BL dans les cellules épithéliales du sac vitellin chez le porc foetal.

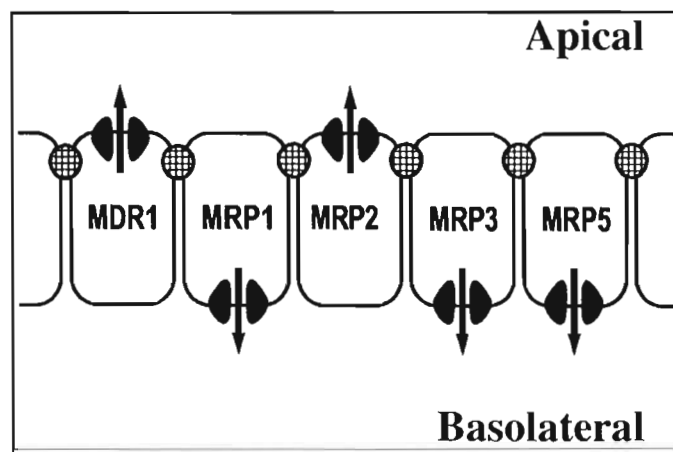


Figure 4. 2 – Localisation des transporteurs MRP et sens du transport de chacun. Le transporteur MDR1 de la famille des transporteurs MDR (abordé ci-dessous) y est aussi représenté. Tiré de Borst et al., 1999.

Leur rôle physiologique est donc de protéger l'organisme en pompant différents conjugués anioniques à l'extérieur des cellules. Par exemple, MRP2 a comme rôle de pomper certains xénobiotiques dans la bile, l'urine ou la lumière intestinale.

Les travaux de Hirohashi *et al.* (2000) ont démontré que les cellules Caco-2 en phase de prolifération expriment des niveaux importants d'ARNm de MRP2 mais très peu de MRP1 et MRP5. Inversement, l'expression de MRP3 augmente significativement pendant cette même phase de prolifération.

4.5.1.2 Les transporteurs MDR

Un obstacle de première importance dans le traitement du cancer est la résistance aux agents chimiothérapeutiques anti-tumoraux. Cette résistance est normalement due à la présence de transporteurs MDR dont le plus étudié est l'isoforme MDR1 aussi appelé glycoprotéine P (Pgp). Ces transporteurs, comme certains MRP, sont surexprimés dans les

cellules tumorales. Contrairement aux MRP qui sont situés du côté BL ou du côté AP dépendamment de l'isoforme, les MDR sont situés uniquement du côté AP de la cellule. Ils ont la capacité de transporter uniquement vers l'extérieur certains xénobiotiques comme par exemple les drogues chimiothérapeutiques. Cette capacité à pomper vers l'extérieur certaines molécules confère donc à la cellule une résistance à de nombreux agents cytotoxiques. Une inactivation ou une altération de ces transporteurs provoquera une sensibilité accrue envers certains toxiques.

L'activité principale des MDR est de transporter à travers la membrane des molécules hydrophobes comme plusieurs composés cytotoxiques mais contrairement aux transporteurs MRP, les transporteurs MDR n'expulseraient que des substrats non conjugués. Leur rôle physiologique en absence de stress exogène reste toujours inconnu, aucun substrat endogène n'ayant encore été identifié.

La structure du transporteur MDR1 est caractéristique de la superfamille des transporteurs ABC. Elle est donc composée de 4 domaines: 2 domaines transmembranaires chacun composé de 6 régions transmembranaires et deux domaines cytoplasmiques liant les nucléotides, soit l'ATP (Fig. 4.3).

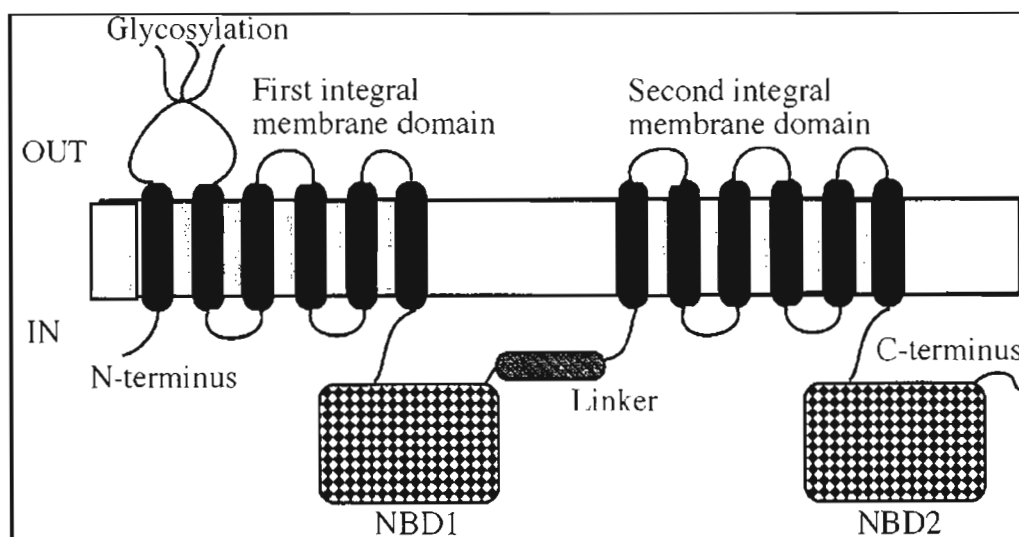


Figure 4. 3 – Structure secondaire du transporteur MDR1. NBD1 et NBD2 sont des acronymes pour Nucleotides Binding Domain 1 et 2. Tiré de Higgins *et al.*, 1997.

Anderle *et al.* (1997) ont démontré que des monocouches de cellules Caco-2 récemment confluentes expriment MDR1. Leurs travaux ont aussi démontré que l'expression était influencée par les conditions de culture des cellules. En effet, lorsque les cellules étaient repiquées au stade post-confluent, l'expression de MDR1 diminuait tandis que lorsque le repiquage s'effectuait sur des cellules au stade pré-confluent, l'expression de MDR1 augmentait après une longue période de culture. Ils ont aussi démontré que les cellules cultivées dans des flasques de polystyrène avaient des niveaux inférieurs de MDR1.

4.5.1.3 Implication des transporteurs ABC dans le transport du Cd

Il a été démontré que les transporteurs ABC jouent un rôle dans le transport du Cd. Chez le nématode *Caenorhabditis elegans* dont la souche sauvage est hautement tolérante au Cd l'inactivation du gène *mrp-1* ou du gène *mdr-1* (respectivement homologues aux gènes *MRP1* et *MDR1* chez l'humain) résulte en une sensibilité accrue au Cd. Suite à une exposition de 6 jours à 80 μM de Cd, 50 % des animaux de la souche sauvage ont survécu comparativement à seulement 20 % des mutants *mdr-1* et à moins de 5 % des mutants *mrp-1* (Broeks *et al.*, 1996).

En utilisant des rats mutants GY exprimant un transporteur MRP2 (cMOAT) déficient, Dijkstra *et al.* (1996) ont démontré que le transporteur MRP2 présent principalement au niveau du foie est impliqué dans l'excrétion biliaire du Cd. Suite à l'administration intraveineuse de Cd (400 nmol/100g de poids corporel), aucune trace de Cd n'a pu être détectée dans les échantillons biliaires après une période de 3½ h chez les rats GY tandis que chez les rats normaux 17.4 ± 3 % de la dose administrée a pu être détectée.

4.5.2 Superfamille des SLC

La superfamille des SLC (*solutes carriers*) comprend des transporteurs membranaires n'utilisant pas l'ATP. Ils transportent donc différents composés selon un gradient de concentration par diffusion facilitée.

La superfamille des SLC est composée de deux familles distinctes soit SLC21 et SLC22. Certains des transporteurs de cette superfamille sont hautement spécifiques alors que d'autres sont plutôt à faible spécificité et ont un large spectre de substrats.

4.5.2.1 Famille des SLC21

Les membres de la famille SLC21 qui sont des transporteurs de polypeptides organiques anioniques sont au nombre de 9 chez l'humain. Ces derniers transportent une variété de composés anioniques dépassant généralement 450 Da comme des sels biliaires, des hormones stéroïdiennes et leur conjugués. Ils ne seront pas ciblés dans cette étude.

4.5.2.2 Famille des SLC22

La deuxième famille nommée SLC22 compte 12 transporteurs chez l'humain et comprend les transporteurs de cations organiques (OCT), les transporteurs de carnitides (OCTN2/SLC22A5), les échangeurs anioniques d'urate (URAT1/SLC22A12) et plusieurs transporteurs d'anions organiques (OAT). Généralement les transporteurs de cations organiques (OCT) sont responsables du transport bidirectionnel de petits composés hydrophiles de tailles variant entre 60 et 350 Da comprenant au moins une partie amine chargée positivement à pH physiologique (Jonker et Schinkel, 2003).

Mis à part leur rôle possible dans la clairance des xénobiotiques, les transporteurs OCT sont aussi impliqués dans l'élimination de composés cationiques endogènes contenant un groupement amine comme les neurotransmetteurs sérotonine et dopamine. Le premier membre de la famille, OCT1 (SLC22A1), a été décrit chez le rat et est composé de 556 acides aminés formant 12 régions transmembranaires (TMD) avec des extrémités N- et C-terminales situées du côté intracellulaire (Jonker et Schinkel, 2003). Aussi, la première boucle située entre le TMD1 et le TMD2 est plus grande que les autres et contient 3 sites de N-glycosylation. Ces trois sites sont probablement impliqués dans la stabilité et l'orientation de la protéine au sein de la bicouche lipidique ou dans la protection contre les protéases extracellulaires (Fig.4.4). On ne le retrouve que du côté BL des cellules polarisées (Karbach *et al.*, 2000).

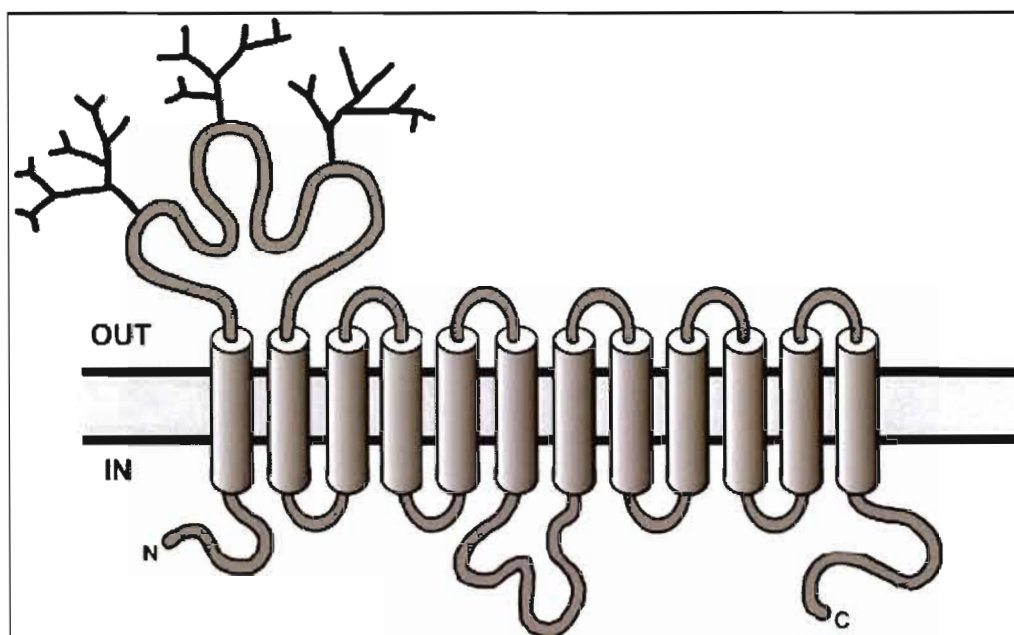


Figure 4. 4 – Structure secondaire du transporteur OCT1. Tiré de Jonker et Schinkel, 2003.

Le deuxième membre de la famille des SLC22, OCT2 (SLC22A2), est homologue à OCT1 à 67 %. Toujours chez le rat, la protéine est composée de 593 acides aminés et sa masse moléculaire atteindrait 66 kDa.

Pour OCT1 et OCT2, les substrats pour lesquels le transport a directement été démontré sont le tétraéthylammonium (TEA), le 1 méthyl-4-phénylpyridinium (MPP⁺) et des médicaments anti-parkinsoniens comme l'amantadine et le memantine (Busch *et al.*, 1998; Gorboulev *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1998, 1999; Wu *et al.*, 2000).

L'absence d'OCT1 a un effet majeur sur la pharmacocinétique du TEA. En effet, l'accumulation dans le foie de TEA administré par voie intraveineuse a été fortement réduite (85 et 77 % après respectivement 20 min et 60 min de traitement) chez les souris *knock out Oct1^{-/-}* comparativement aux souris normales. Ces résultats indiquent que pour le TEA, OCT1 est le transporteur principal vers le foie. De plus, l'excrétion directe de TEA par l'intestin grêle chez la souris *Oct1^{-/-}* a été réduite d'environ 50 %. Cela démontre que, dans les entérocytes, OCT1 serait en partie responsable de l'influx BL nécessaire à l'excrétion subséquente vers la lumière intestinale (Jonker *et al.*, 2001).

Chez l'humain, OCT1 et OCT2 sont aussi responsables du transport de certaines prostaglandines anioniques (Koepsell et Gorboulev, 1999). Une charge positive n'est donc pas impérative pour qu'un composé soit un substrat des OCTs (Jonker et Schinkel, 2003). Aussi, OCT1 et OCT2 sont surtout exprimés au niveau des organes excréteurs majeurs, soit le foie et les reins, et ce, du côté BL uniquement. Bien qu'il ne soit pas ubiquiste, OCT3 a une distribution beaucoup plus vaste. On le retrouve en effet dans le cortex cérébral, le cœur, le rein et l'aorte.

Ces 3 transporteurs ont les mêmes caractéristiques de transport. Ce sont des transporteurs de type uniport dont la direction peut être inversée selon le gradient de concentration et dont le fonctionnement est indépendant du Na^+ (Gorboulev *et al.*, 1997; Gründemann *et al.*, 1994; Kekuda *et al.*, 1998; Koepsell, Gorboulev et Arndt, 1999)

Jusqu'à maintenant, trois transporteurs de carnitine ont été identifiés. Il s'agit d'OCTN1, OCTN2 et OCTN3. Ces derniers appartiennent à la même famille que les OCTs et diffèrent au niveau de leur affinité et capacité à transporter la carnitine, ainsi que de leur énergie d'activation et de leur localisation membranaire (côté AP des cellules). Ce sont des cotransporteurs qui diffèrent aussi au niveau de leur sensibilité aux inhibiteurs. Il a été rapporté que le transport par OCTN1 est significativement diminué (30 %) à pH acide (pH 6) (Tamaï *et al.*, 1997). Yabuchi *et al.* (1999) ont démontré que le transport de TEA par OCTN1 n'est pas dépendant du Na^+ .

D'après Bleasby *et al.* (2000) de même que Martel *et al.* (2001) les cellules Caco-2 expriment de l'ARNm de deux isoformes de transporteurs OCT; OCT1 et OCT2 et ce, tant à l'état de pré-différenciation qu'à l'état de post-différenciation. Les travaux de Seithel *et al.* (2006) ont pu démontrer que les cellules Caco-2 expriment aussi de l'ARNm d'OCT3 et d'OCTN2 aussi indépendamment du stade de différenciation sans avoir pour autant mesurer les niveaux protéiques.

4.5.2.3 Implication des transporteurs SLC dans le transport du Cd

À notre connaissance, rien n'a été démontré en ce qui concerne le transport de Cd et/ou d'autres métaux par les transporteurs SLC. Ceci devrait être étudié en rapport avec la spéciation puisque ces transporteurs impliquent des cations/anions organiques. Les complexes organiques chargés ou neutres sont donc susceptibles d'être transportés par les SLC.

CHAPITRE V

PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE

5.1 Problématique

Comme nous l'avons vu précédemment, le Cd est un métal lourd auquel l'humain est susceptible d'être exposé via l'ingestion et/ou l'inhalation. Suite à l'exposition, le Cd sera absorbé dans différentes proportions dépendamment de la voie empruntée ($\leq 5\%$ du Cd ingéré comparativement à 25-60 % du Cd inhalé).

Une fois ingéré, le Cd a la possibilité d'être transporté à travers l'épithélium intestinal en traversant la membrane AP, le cytoplasme et la membrane BL de l'entérocyte. Il est alors absorbé par l'organisme et s'accumule principalement dans les reins et le foie. Une autre partie du Cd reste lié à des protéines en circulation dans le sang et un équilibre d'échange s'établit entre les fractions liées tissulaires et plasmatiques. Le Cd en circulation peut être transporté du côté BL de l'entérocyte et être plus ou moins efficacement expulsé du côté AP dans la lumière intestinale.

5.2 Objectifs de recherche

L'objectif général de notre recherche consiste donc à évaluer dans quelle mesure l'épithélium intestinal pourrait contribuer à excréter le Cd absorbé.

Le premier objectif sera de caractériser le transport transépithélial BL vers le côté AP grâce à différentes stratégies expérimentales. Le second objectif sera d'évaluer quels transporteurs sont impliqués dans le transport du Cd et dans quelle proportion ils y jouent un rôle.

5.3 Hypothèses

Sachant que chez les souris *knock-out Oct1^{-/-}* l'absence du transporteur OCT1 situé du côté BL de l'entérocyte diminue significativement l'excrétion directe de TEA par l'intestin grêle, notre première hypothèse stipule donc qu'OCT1 pourrait jouer un rôle dans le transport du Cd du côté BL (influx) dans les cellules Caco-2 et TC7 servant de modèle *in vitro* pour les entérocytes humains.

Notre deuxième hypothèse stipule que les transporteurs de type MDR ou MRP localisés du côté AP de l'entérocyte (respectivement P-gp et cMOAT), pourraient être impliqués dans l'efflux AP de Cd qui se trouverait ainsi éliminé dans les selles.

L'épithélium intestinal jouerait donc un rôle d'excréteur et ce, même si le Cd n'est pas rejeté du côté apical. En effet, l'épithélium intestinal étant renouvelé tous les 4 à 6 jours, les cellules matures ayant emmagasiné du Cd par influx BL pourront être éliminées par exfoliation impliquant de l'apoptose dans la lumière intestinale et se retrouver dans les selles.

5.4 Méthode expérimentale

Dans cette étude, plusieurs stratégies expérimentales ont été utilisées afin de nous permettre de caractériser le transport transépithélial de Cd et ainsi mieux définir l'implication des différents transporteurs. Pour ce qui est de l'influx BL, nous avons tout d'abord vérifié si le transport de Cd dans les cellules TC7 était dû simplement à de la diffusion passive ou à des transporteurs. Pour ce faire, nous avons utilisé du Cd non radioactif en concentration saturantes par rapport au K_m de transport. Les transporteurs spécifiques étant saturés par le Cd non radioactif, nous pouvons considérer que l'accumulation cellulaire de Cd radioactif (^{109}Cd) se fait alors par diffusion simple. La comparaison de cette mesure avec celle obtenue en absence de Cd non radioactif, nous a permis de déterminer la proportion du transport de ^{109}Cd attribuable à des transporteurs spécifiques. Certains transporteurs sont connus comme étant influencés par le pH, donc des expériences de transports ont aussi été faites avec des milieux d'exposition à différents pH. Nous avons aussi fait varier la spéciation du Cd car certaines formes de Cd sont suspectées être mieux transportées que d'autres et les variations de transport en fonction de la spéciation nous ont fourni des indices sur les

systèmes de transport possiblement impliqués. Enfin, des inhibiteurs spécifiques aux systèmes de transports ciblés ont été utilisés afin de mieux préciser leur implication dans le transport du Cd.

En ce qui concerne l'efflux de Cd du côté AP, nous avons utilisé des inhibiteurs spécifiques aux systèmes d'efflux ciblés par notre étude. Nous avons aussi effectué une cinétique d'efflux de ^{109}Cd en présence et en absence de Cd non radioactif dans le milieu d'efflux afin de mieux caractériser le mécanisme des systèmes de transport impliqués.

DEUXIÈME PARTIE

PRÉSENTATION DES RÉSULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE VI

ARTICLE

CHARACTERIZATION OF TRANSEPTITHELIAL TRANSPORT OF CADMIUM IN TC7 CELL MONOLAYERS GROWN ON FILTERS

Carrière, P, Jumarie, C¹

Département des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888
Succ. Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8

¹To whom correspondence should be addressed:
E-mail: jumarie.catherine@uqam.ca
Telephone: (514) 987-3000 (ext: 7680)
Fax: (514) 987- 4647

6.1 Abstract

Cadmium (Cd) to which general population is exposed by the ingestion of contaminated food, is a highly toxic metal responsible for renal lesions and bone disorders. The intestinal absorption of Cd has been largely studied but the role played by the intestinal epithelium in metal excretion has never been considered. Under chronic intoxication conditions, blood Cd could be transported into the enterocyte at the basolateral (BL) side. Then metal excretion could occur by cellular efflux at the apical (AP) side of the enterocyte or the enterocyte could simply accumulate Cd until cell shedding during the intestinal epithelium renewal. The aim of our study was to characterize Cd transport in the BL-to-AP direction. We used the highly differentiated TC7 clone of the human intestinal cell line Caco-2 grown on filters. Our hypotheses were: 1) a member of organic cation transporters (OCT1) may be involved in Cd uptake at the BL membrane; 2) the AP efflux of Cd could be mediated by efflux pumps such as MDR1 or MRP2. Our results show that BL uptake of $0.5 \mu\text{M}$ ^{109}Cd was enhanced at pH 8.5 in a chloride medium but not in nitrate medium (used to optimize the level of Cd^{2+} over chloro-complexes (CdCl_n^{2-n}) formation) suggesting the involvement of OCT1 in the uptake of CdCl_n^{2-n} but not Cd^{2+} . In the presence of cimetidine, an OCT1 inhibitor, a 37 % decrease was observed in the 1-h BL uptake of ^{109}Cd . The cellular AP 30-min efflux of Cd was decreased by 20 % in the presence of verapamil or probenecid, inhibitors of MDR1 and MRP2, respectively. Our results suggest that OCT1, at the BL membrane, and MDR1 and MRP2, at the AP membrane, are involved in the transepithelial transport of Cd in the BL-to-AP direction in TC7 cells. Furthermore, the presence of unlabeled Cd into the AP efflux medium enhanced cellular ^{109}Cd release. This result suggests that in addition to MDR1 and MRP2, counter exchange mechanisms may also be involved in the AP cellular efflux of Cd. We conclude that the intestinal epithelium could play a role in blood Cd excretion. This putative role clearly deserves further investigation *in vivo*.

Keywords: Metal transport, Cd, OCT1, MRP2, MDR1, Basolateral membrane, intestinal epithelium, Caco-2 cells.

6.2 Introduction

Cadmium (Cd) is a non essential metal that can be toxic even at very low concentrations. Beside smokers, the major source of exposure to Cd for general population is via contaminated food ingestion; particularly root vegetables, meat offals and shellfish (Friberg *et al.*, 1985). Less than 5 % of the total Cd ingested is absorbed by the intestinal epithelium but its biological half-life in human has been estimated around 20 years (Pinot *et al.*, 2000). After entering systemic circulation, Cd binds itself to plasma proteins such as albumin (Foulkes and Blanck, 1990; Roberts and Clark, 1988) via high affinity sulfhydryl groups (Nordberg *et al.*, 1985) and is mainly accumulated in the liver and the kidney. Until now, the intestinal uptake of Cd has been studied in relation with metal oral absorption, i.e. Cd transfer from the intestinal lumen to the blood circulation. However, following chronic contamination, the intestinal epithelium may also be exposed to significant levels of Cd in the blood. In adults, Cd blood level of 0.47 µg/L for non smokers and 1.58 µg/L for smokers were estimated (ATSDR, 1999). Moreover, previous studies have shown that Cd can be taken up at the basolateral (BL) side of the cell, faced to the blood circulation, at a much higher rate compared to the apical (AP) uptake in rat hepatocytes (Shaikh *et al.*, 1995) and in the human intestinal cell line Caco-2 (Jumarie *et al.*, 1999). Consequently, it would be interesting to consider the intestinal epithelium as an excretory tissue for Cd. Once transported in the enterocyte from the blood, Cd could be excreted in the lumen through the AP membrane. Also, because of the rapid renewal of the intestinal epithelium (4 to 6 days, Traber, 1994), Cd trapped into the enterocytes could be excreted during this shedding process.

In the past, many studies have already pointed out that target organs such as the kidney and the liver can also act as excretory organs for Cd (Rahola *et al.*, 1973; Kjellstrom and Nordberg 1978; Adamsson *et al.*, 1979; Rusch *et al.*, 1986; Buchet *et al.*, 1990). Shaikh *et al.* (1995) reported that the entire specific transport component of Cd at the BL side of rat hepatocytes did not require energy and consequently was not an active process. The BL uptake of Cd would occur primarily via ion channels or carriers. These authors had similar conclusions about the specific transport of Cd at the BL side of rat renal cortical epithelial cells. OCT1 is a member of the organic cation transporters family which is expressed only at the BL side of the liver, kidney and intestinal cells where it plays a role in drug and

xenobiotic absorption and excretion (Koepsell and Endou, 2004). This transporter carries a broad range of substrate by facilitated diffusion depending of concentration so transfer of substrate can be in either direction: from the blood to the cell as well as from intracellular compartment to the blood.

Following BL uptake of Cd, the cellular efflux through the AP membrane would be the second step in the overall process of intestinal metal excretion. Some studies also demonstrated that ATP binding cassette transporters are involved in Cd transport. Studies from Broeks *et al.* (1996) demonstrated that in *Caenorhabditis elegans*, a species of nematode known to be very tolerant to Cd, inactivation of the *mdr1* gene resulted in an acute sensibility to Cd. Similarly, Dijkstra *et al.* (1996) demonstrated that MRP2 played a role in the biliary excretion of Cd in rats. MDR1 and MRP2 act as strict efflux pumps and both play critical role in natural defense against drugs and xenobiotics toxicity for which they greatly influence the bioavailability and disposition (Hoffmann and Kroemer, 2004). Active efflux is an important parameter of cellular detoxification since it prevents the accumulation of conjugated as well as unconjugated compounds that can potentially be toxic.

To our best knowledge, very little information is known about metal excretion by the intestinal epithelium and even less is known about the transporters responsible for the BL uptake and the AP efflux in the enterocyte. The aim of our study was to characterize these processes for the transepithelial transport of Cd in the BL-to-AP direction. Our first hypothesis is that OCT1 could be involved in Cd transport at the BL membrane of enterocytes. Our second hypothesis is that Cd efflux might involve MDR1 and MRP2. We have used TC7 cell monolayers, a well differentiated clone of the human intestinal cell line Caco-2 (Chantret *et al.*, 1994). Numerous human colon carcinoma cell lines such as Caco-2, T-84 and HT-29 have been characterized with various levels of differentiation in culture (Pinto *et al.*, 1983; Zweibaum *et al.*, 1985; Huet *et al.*, 1987). One interesting feature of the Caco-2 cells is that they undergo a spontaneous differentiation which starts as soon as the cells reach confluence with tight junction formation. Two weeks post-confluence, they show well-developed microvilli at the AP membrane (brush border membrane) and express high levels of sucrase activity, a specific marker of mature enterocyte (Jumarie et Malo, 1991) as well as nutrients transport (Hauri *et al.*, 1985; Rousset *et al.*, 1989; Howell *et al.*, 1992). They

also form domes which is in accordance with their ability to proceed with transepithelial transport processes. These cells have been largely used as a relevant *in vitro* model for mature enterocyte.

6.3 Material and methods

6.3.1 Cell culture

TC7 cells, clone isolated from the Caco-2 cell line, were kindly supplied by Dr. Zweibaum (Chantret *et al.*, 1994). They were used between the 69th and 77th passages. Stock cultures were grown in 75 cm² plastic flasks at a density of 1×10^6 cells/flask in Dulbecco's modified Eagle essential minimum medium (DMEM) containing 25 mM glucose and supplemented with 15 % inactivated (56°C for 30 min) fetal bovine serum (FBS), 0.1 mM nonessential amino acids, and 50 U/ml-50 µg/ml penicillin streptomycin. Cells were maintained in a 5 % CO₂ - 95 % air atmosphere and the medium was changed every other day. Stock cultures were passaged weekly by trypsinization (0.05 % trypsin - 0.53 mM EDTA).

For all experiments, cells were seeded at a density of 12×10^3 cells/cm² on tissue culture-treated polyester filters (Transwell[®] cell culture inserts, 12 mm diameter, 0.4 µm pore size) and allowed to grow for 21 days. The culture system consists of filters inserted into wells in a way that two compartments can be physically divided: the upper and the lower compartment. The upper one contains luminal medium facing the brush border membrane (AP compartment) and the lower one contains serosal medium facing the basolateral side of the cell membrane (BL compartment). The main advantage of this system is the access of AP and BL sides of the cell monolayers for exposure and also the possibility of sampling without any Cd access from one compartment to the other except through the cell monolayers (transepithelial transport).

6.3.2 Integrity of cell monolayers

The integrity of the cell monolayers was tested by measuring the transepithelial electrical resistance (TEER) using an EVOM Epithelial Voltohmmeter (World Precision Instruments, Sarasota, FL) after washing the monolayers three times with room temperature Cd-free transport medium (see section 6.3.3). For each filter, the TEER was determined at three different places on the cell monolayer. The values, expressed as ohms square per centimeter, are reported after subtracting the intrinsic resistance of the filters without cells

($123 \pm 8 \Omega \cdot \text{cm}^2$). Only cell monolayers with $\text{TEER} \geq 250 \Omega \cdot \text{cm}^2$ were used for subsequent uptake and efflux experiments.

6.3.3 Basolateral Cd accumulation and transport measurements

Cd accumulation and transepithelial transport in TC7 cells were performed at room temperature on 21-days-old cells in chloride (Cl^-) transport medium containing 137 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 4mM D-glucose, 1.2 mM MgSO_4 , 2.5 mM CaCl_2 and 10 mM HEPES, adjusted to pH 7.4. Before exposition, cell monolayers were washed three times with 0.5 and 1.5 ml of ^{109}Cd -free transport medium at the AP and BL sides respectively, in order to remove the culture medium containing serum. Because different chemicals species can be transported through different mechanisms, speciation of Cd in the exposure medium may affect its biodisponibility. Therefore, cellular accumulation of ^{109}Cd was also performed using nitrate (NO_3^-) exposure medium: Cd complexation by NO_3^- is much less compared to that by Cl^- thus about 80 % of the total dissolved Cd is recovered as free Cd^{2+} compared to 15 % in the presence of Cl^- . NO_3^- medium contained 137 mM NaNO_3 , 5 mM KNO_3 , 2.5 mM CaNO_3 , 1.2 mM MgSO_4 , 4 mM D-glucose and 10 mM HEPES adjusted to pH 7.4.

Accumulation experiments were started by incubating cells in 0.5 ml (AP exposure) or 1.5 ml (BL exposure) transport medium containing $0.5 \mu\text{M}$ ^{109}Cd labeled CdCl_2 (specific activity from 1.5 to 3 mCi/mmol). Some uptake and efflux experiments were carried out in the presence of $100 \mu\text{M}$ unlabeled Cd used as a pure competitive inhibitor (Jumarie *et al.*, 1997).

Following exposure times, 0.5 (AP) or 1.5 ml (BL) of the incubation medium in the compartment opposite to that of exposure to ^{109}Cd were sampled. Tracer accumulation was stopped by removing the transport medium. Then, monolayers were rapidly rinsed three times with 0.5 ml (AP side) and 1.5 ml (BL side) of ice-cold ^{109}Cd -free stop medium containing 2 mM EDTA (Ca- and Mg-free) to chelate and remove tracer at the external surface of the cell membrane. The filters were carefully excised from the inserts. Cells and media samples were then used for radioactivity determination using a Cobra II gamma counter (Canberra Packard Instrument, Canada).

To test transport mechanisms sensitivity to pH, cellular accumulation studies were conducted at pH 5.5 and 8.5. Albumin (BSA) was also added in the BL transport medium to determine whether Cd-BSA complexes could be transported into the cells. We used OCT1 inhibitors (MPP⁺, TEA and cimetidine) and MDR1 and MRP2 inhibitors (verapamil and probenecid, respectively) at the BL and AP side, respectively, to determine whether these transporters play a role in Cd transport through TC7 cell monolayers.

For each experiment, cells from three monolayers of the same passage were washed three times with ¹⁰⁹Cd-free transport medium, dissolved in 300 µl NaOH 1N and used for protein determination according to Bradford (Bradford, 1976) using bovine serum albumin as the calibration standard.

In the present paper, accumulation corresponds to the total amount of ¹⁰⁹Cd measured in cell samples while transport data (transepithelial transport) refer to the total amount of tracer that crossed the monolayers (in the BL-to-AP direction) and that is recovered in the medium opposite to the exposure side. Accumulation and transport are both expressed in picomoles of ¹⁰⁹Cd per milligram of protein, the amount of tracer transported being calculated for the total volume of the medium in the compartment opposite to that exposed to ¹⁰⁹Cd.

6.3.4 Apical Cd efflux measurement

Cd efflux measurements were performed at room temperature on 21-days-old TC7 cell monolayers. The first step was to expose the cells at the AP side to 0.5 µM ¹⁰⁹Cd for 2 h, at which time, accumulation processes were stopped as described in the previous section, but using room temperature ¹⁰⁹Cd-free and EDTA-free stop medium. Monolayers were then incubated with 0.5 ml ¹⁰⁹Cd-free medium in the AP compartment. At specific times of efflux, 0.3 ml of the AP media was sampled and the cells were rapidly washed three times with ice-cold EDTA stop solution. The filters were then excised from the inserts and cells and media samples were used for radioactivity determinations.

6.3.5 Data analysis

6.3.5.1 Accumulation studies

Nonlinear regression analyses of the accumulation (A : pmol/mg protein) time-course data obtained over a 6-h exposure on the AP or the BL sides were performed using the first-order rate Eq. (6.1)

$$A = A_{\max}(1 - e^{-kat}) + A_0 \quad \text{Eq. (6.1)}$$

in which A_0 represents the zero-time accumulation value, A_{\max} refers to the maximum accumulation value when intracellular accumulation of Cd reaches kinetic equilibrium and ka (hrs^{-1}) represents the time constant of the overall process of accumulation ($t_{1/2} = \ln 2/k$). Accumulation data obtained over the 0 to 5-min time range were analyzed according to the linear Eq. (6.2)

$$A = v.t + A_0 \quad \text{Eq. (6.2)}$$

in which the initial rate v of accumulation (uptake) is the slope of the regression line.

6.3.5.2 Efflux studies

Nonlinear regression analyses of the efflux (E : pmol/mg protein) time-course data were performed using the first-order decay Eq. (6.3)

$$E = (E_0 - E_e)e^{-k_E t} + E_e \quad \text{Eq. (6.3)}$$

in which E_0 represents the cellular accumulation of ^{109}Cd at time $t = 0$ of efflux and E_e stands for the plateau of efflux reached with the first-order rate constant k_E (min^{-1}). Data obtained for the cellular ^{109}Cd released (R : pmol/mg protein) in the AP compartment were analyzed according to the first-order rate Eq. (6.4)

$$R = R_e(1 - e^{-k_R t}) \quad \text{Eq. (6.4)}$$

in which Re stands for the maximal amount of ^{109}Cd that it is recovered in the efflux medium with the rate constant $k_R (\text{min}^{-1})$.

6.3.5.3 Statistical analysis

Nonlinear regression analyses were performed using Prism 4.0 software (GraphPad Software, San Diego, California, USA). The errors associated with the kinetic parameters are the standard errors of nonlinear regression (SER). Student t test and analysis of variance (ANOVA) were performed for one-time point measurements. Dunnett test were performed for comparisons to control and Tukey-Kramer to compare treatments to each other. Statistical significance was assessed at the $P < 0.05$ level.

6.3.6 Materials

All culture ware came from Corning. DMEM, penicillin, streptomycin, and trypsin were purchased from Gibco BRL (Grand Island, NY). FBS was obtained from PAA Laboratories (Montréal, QC, Canada). Nonessential amino acids namely L-alanine, L-asparagine, L-glutamic acid, L-proline, and L-serine, were obtained from Gibco BRL. L-aspartic acid and glycine were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Labeled $^{109}\text{CdCl}_2$ was obtained from (Eckert & Ziegler, Berlin, Germany) and unlabeled CdCl_2 from Sigma Chemical Co. BSA, TEA, MPP^+ , chlorpromazine, methyl B cyclodextrine and probenecid were obtained from Sigma Chemical Co. Verapamil and cimetidine were obtained from Calbiochem (San Diego, CA).

6.4 Results

Cd transport and TEER monitoring in mature well differentiated TC7 cell monolayers

Fig.6.1 illustrates the growth profile of TC7 cells grown on filters for 21 to 31 days. The 2-h BL cellular accumulation of ^{109}Cd in mature TC7 cells decreased as a function of days in culture (filled circles). At day 21, cellular accumulation was 88.7 ± 3.1 pmol $^{109}\text{Cd}/\text{mg}$ protein. A 46 % decrease was observed between day 21 and day 25, accumulation at day 25 being 48.0 ± 0.5 pmol $^{109}\text{Cd}/\text{mg}$ protein. Between day 25 and day 31, another important 42 % decrease was observed. Indeed, the 2-h cellular accumulation at day 31 dropped to 28.7 ± 7.0 pmol $^{109}\text{Cd}/\text{mg}$ protein. The evolution of TEER was also measured and tend to increase as a function of days in culture (open circles). Means values estimated on three mature cell cultures were $438 \pm 6 \Omega.\text{cm}^2$ at day 21, $449 \pm 45 \Omega.\text{cm}^2$ at day 25 and $517 \pm 22 \Omega.\text{cm}^2$ at day 31.

Fig. 6.2 illustrates TEER variation of TC7 cells grown on filters as a function of time of BL exposure to $0.5 \mu\text{M}$ ^{109}Cd over a 8-h period of time. At zero time of exposure control, TEER value was $320 \pm 43 \Omega.\text{cm}^2$. A slight decrease in TEER was observed after 15 min ($275 \pm 10 \Omega.\text{cm}^2$) but at 2 h, TEER were $358 \pm 34 \Omega.\text{cm}^2$ and even increased to $409 \pm 29 \Omega.\text{cm}^2$ at 4-h. Between 4 and 8-h, TEER values remained stable and were $399 \pm 12 \Omega.\text{cm}^2$ at 8-h.

Time course of cellular accumulation and transepithelial transport with respect to the side of exposure in pre and post-confluent cells

The accumulation time-course of $0.5 \mu\text{M}$ ^{109}Cd over a 6-h exposure on either the AP (open circles) or the BL (filled circles) side is shown in Fig. 6.3. In both cases, the kinetics of accumulation could be well analyzed according to the first-order rate Eq. (6.1) which describes a zero-time (A_0) and a maximal accumulation (A_{max}). Cd accumulation and transepithelial measurements were conducted in pre-confluent (day 10) and post-confluent (day 21) TC7 cells grown on filters. Kinetic of Cd accumulation in 10-days old cells was similar whatever the side of exposure with k_a and A_{max} of $0.16 \pm 0.04 \text{ h}^{-1}$ and 90.4 ± 12.7 pmol/mg protein for the AP accumulation respectively and $0.16 \pm 0.07 \text{ h}^{-1}$ and 98.2 ± 24.5

pmol/mg protein for the BL accumulation respectively (Fig. 6.3A). The AP and BL cellular accumulation of ^{109}Cd in pre-confluent cells proceeded with a $t_{1/2}$ of 4.4 ± 0.3 h and 4.2 ± 0.9 h, respectively. Kinetic of Cd accumulation in post-confluent cells was markedly different with respect to the side of exposure: k_a and A_{max} were 0.24 ± 0.31 h $^{-1}$ and 50 ± 29 pmol/h/mg protein, respectively, with a $t_{1/2}$ around 3 h for the AP accumulation, whereas values of 0.39 ± 0.20 h $^{-1}$ and 108 ± 18 pmol/h/mg protein with a $t_{1/2}$ of 1.8 ± 0.7 h were estimated for the BL accumulation (Fig. 6.3B). As expected, the transepithelial transport of ^{109}Cd through cell monolayers was much more important in pre-confluent (Fig. 6.3C) compared to post-confluent cells (Fig. 6.3D). Following linear regression analyses of the data points according to Eq. (6.2), the rate constant of the transepithelial transport of Cd (v) through 10-days-old cell monolayers was 5.1 ± 0.7 and 10.1 ± 0.9 pmol/h/mg protein for the AP and the BL exposure, respectively. In 21-days-old cells, values of v were 0.04 ± 0.02 and 1.01 ± 0.07 pmol/h/mg protein for the AP and the BL side, respectively. Interestingly, transepithelial transport was more important when cells were exposed at the BL side in pre and post-confluent cells.

According to results shown in Figures 6.1, 6.2 and 6.3, all subsequent experiments were performed on well-differentiated 21-days-old TC7 monolayers with non leaking tight junctions for up to 8 h following exposure to $0.5 \mu\text{M}$ Cd.

Rapid initial accumulation of Cd at the BL side

Fig. 6.4 shows that tracer uptake was linear over a 4.5-min incubation period on the BL side. Therefore, all subsequent BL uptake measurements were performed on a 3-min period under initial uptake rate conditions, except for the exposure to inhibitors.

BL cellular accumulation and transepithelial transport of Cd under inorganic conditions

Accumulation of $0.5 \mu\text{M}$ ^{109}Cd was measured after a 3-min incubation period at the BL side in the absence (open column) or in the presence of $100 \mu\text{M}$ unlabeled Cd (dashed column) (Fig. 6.5). The presence of unlabeled Cd in sufficiently high concentrations relative

to the K_m of 5 μM (Jumarie *et al.*, 1997) allows us to determine the contribution of the nonspecific component of transport in the overall process of Cd accumulation which represents 40% of the total cellular accumulation. A significant decrease of ^{109}Cd uptake was observed in the presence of unlabeled Cd ($P \leq 0.05$). Tracer accumulation in the presence of unlabeled Cd can be directly related to passive diffusion through the cellular membrane.

Because metal speciation in the exposure medium affects metal bioavailability and because different species may enter cells by different transport mechanisms (Fortin and Campbell, 2000), cells were exposed to 0.5 μM ^{109}Cd in two different media in the presence and absence of 100 μM unlabeled Cd. MINEQL⁺ calculations predict that under Cl^- conditions, only 14 % of the total dissolved metal is present as Cd^{2+} (see Table 6.1 and 6.2 for Cd speciation under Cl^- and NO_3^- conditions). Therefore to obtain higher level of $^{109}\text{Cd}^{2+}$ we used a NO_3^- transport medium; Cd complexation in the NO_3^- remains negligible (15.7%) compared to the Cl^- (85.2%) and the proportion of $^{109}\text{Cd}^{2+}$ increased to 80 % when Cl^- was changed for NO_3^- . Fig. 6.6 shows that in both media in the presence of 100 μM unlabeled Cd, the uptake of ^{109}Cd is similar (dashed columns). Under Cl^- conditions, variation in pH had significant effects ($P \leq 0.05$). These effects were not observed in the presence of 100 μM unlabeled Cd. The transport of ^{109}Cd was 1.4- and 2.3-fold higher at pH 8.5 compared to pH 7.4 and pH 5.5, respectively. However, in the NO_3^- medium, pH did not have a significant impact on ^{109}Cd accumulation. A slight difference was observed between both media at pH 5.5, however, this difference was not significant ($P \geq 0.05$).

The effect of metal interactions on the 3-min cellular accumulation of 0.5 μM ^{109}Cd is shown in Fig. 6.7. Cells were exposed to tracer at the BL side in the Cl^- transport medium in the presence or in the absence of 5 mM Ca, 100 μM Fe or 100 μM Zn at pH 7.4 (clear column) and pH 8.5 (dashed column). In the absence of Ca, ^{109}Cd uptake decreased by 40 % and 31 % at pH 7.4 and pH 8.5, respectively, compared to results obtained in the presence of 5 mM Ca but these differences were not significant ($P \geq 0.05$). When unlabeled Cd was added to the transport medium, a significant decrease of ^{109}Cd uptake was observed ($P \leq 0.05$) and values estimated under these conditions were similar at pH 7.4 and pH 8.5 and the stimulatory effect of pH 8.5 was no more present. Following correction for the non specific uptake of ^{109}Cd measured in the presence of unlabeled Cd, it can be estimated that Ca-free

medium led to a 55 % and 36 % decrease in ^{109}Cd uptake at pH 7.4 and 8.5, respectively. Similarly, the presence of 100 μM Zn led to an 80 % and 100 % (pH 7.4 and 8.5) inhibition of the specific uptake of ^{109}Cd (Table 6.3). The presence of 100 μM Fe led to a smaller inhibition of 5 % at pH 7.4 and 49 % at pH 8.5. A mixture of 100 μM Zn and 100 μM Fe inhibited completely the specific uptake of Cd at both pH 7.4 and 8.5. Inhibition of Cd uptake was more important at pH 8.5 than at pH 7.4 for all conditions tested.

Three known inhibitors of OCT1 (Koepsell, *et al.*, 2003) were used to determine its possible involvement in ^{109}Cd uptake: MPP⁺ (500 μM), TEA (500 μM) and cimetidine (500 μM). Uptake experiments were conducted in the presence of inhibitors under stimulatory conditions at pH 8.5. Even though there were no significant differences between treatments ($P \geq 0.05$), some tendencies were observed. Fig. 6.8A shows a 29 % stimulation of ^{109}Cd uptake at pH 8.5 compared to pH 7.4 after a 1-h exposition. TEA and MPP⁺ only decreased transport by 15 % and 5 % respectively. The most potent inhibitor was cimetidine with a 37 % decrease. Contrary to the cellular accumulation, the 1-h transepithelial transport in the BL-to-AP direction was not stimulated at pH 8.5 (Fig. 6.8B). In fact, the transepithelial transport of ^{109}Cd decreased by 21 % at pH 8.5. Also, the transepithelial transport increased in the presence of TEA and cimetidine but not in the presence of MPP⁺.

BL cellular accumulation and transepithelial transport of Cd under organic conditions

MINEQL⁺ calculations allow to estimate the level of Cd complexation by increasing concentrations of BSA and the percentage of total dissolved Cd recovered as organic metal species (Cd:BSA or 2Cd:BSA) (Table 6.4). Theoretically, if only inorganic Cd is transported through the BL membrane, we should observe a decrease in ^{109}Cd uptake inversely proportional to increased Cd complexation by increasing concentrations of BSA added in the transport medium. Fig. 6.9 shows that the BL uptake of ^{109}Cd (dashed columns) did not vary with increasing concentrations of BSA and thus did not follow the predicted decreased uptake values (open columns). These results suggest that the BL uptake of ^{109}Cd is not exclusively related to inorganic metal species.

Because albumin is known to penetrate the cell by calveolin- or clathrin-mediated endocytosis (Phonphok and Rosenthal, 1991), two endocytosis inhibitors, chlorpromazine (dashed columns) and methyl β cyclodextrine (dotted columns) which inhibit calveolin-dependent and clathrin-dependent endocytosis, respectively (Wang, *et al.* 1993; Rodal *et al.*, 1999), have been used to determine whether endocytosis may be one putative pathway used by Cd-BSA complexes to penetrate TC7 cells. Results shown in Fig. 6.10 reveal no significant differences between ^{109}Cd uptake levels obtained in the absence or presence of chlorpromazine or methyl β cyclodextrine.

Kinetics of cellular apical Cd efflux

The time-course of ^{109}Cd efflux from TC7 cells was studied following a 2-h pre-incubation to $0.5\ \mu\text{M}$ tracer on the AP side. The remaining cellular tracer following efflux in both standard (open circles) and $100\ \mu\text{M}$ unlabeled Cd-containing (filled circles) media could be analyzed according to the first-order decay Eq. (6.3) in Fig. 6.11A. Both curves look very similar even if the efflux rate seems more rapid in the absence of unlabeled Cd but this was not significant. Parameter efflux values reported in Table 6.5 reveal that efflux in the standard medium is a rapid process (parameters k_E) and that most of the tracer remains in the cells after a 30-min efflux period (parameters E_e compared to E_0). Tracer release into the AP compartment is shown in Fig. 6.11B and data were analyzed according to the first-order rate Eq. (6.4). The presence of $100\ \mu\text{M}$ unlabeled Cd in the efflux medium significantly increased the rate of the release process as shown in Table 6.5.

Cellular ^{109}Cd release in the presence of MDR1 and MRP2 inhibitors

The 30-min cellular efflux of ^{109}Cd following a 2-h pre-incubation to $0.5\ \mu\text{M}$ tracer on the AP side was studied in the absence (open columns) and presence (dashed columns) of $100\ \mu\text{M}$ unlabeled Cd. Inhibitors of MDR1 (verapamil $250\ \mu\text{M}$) and MRP2 (probenecid $500\ \mu\text{M}$) were also added to the efflux medium. Cellular accumulation at zero time efflux is represented by the dotted line in Fig. 6.12A showing that remaining intracellular tracer after a 30-min efflux period was slightly lower in the presence of $100\ \mu\text{M}$ unlabeled Cd in the efflux

medium (66 % compared to 80 % in standard medium). Verapamil and probenecid did not significantly influence the remaining intracellular tracer ($P \geq 0.05$) whether or not unlabeled Cd was present in the efflux medium (Table 6.6). Fig. 6.12B shows that ^{109}Cd release in the efflux medium at 30 min was increased by 42% in the presence of 100 μM unlabeled Cd (dashed columns) and the presence of verapamil and probenecid had an impact on tracer efflux. In the absence of unlabeled Cd, the presence of verapamil and probenecid decreased the amount of tracer recovered in the efflux medium at 30 min (19% and 18% respectively). In the presence of unlabeled Cd, verapamil and probenecid also decreased the amount of tracer recovered in the efflux medium at 30 min by 25% and 21% respectively. Interestingly, the effects of both inhibitors were more important when unlabeled Cd was present in the efflux medium. Also, in both the absence and the presence of Cd, verapamil had the highest inhibitory effect.

6.5 Discussion

Cd Transport and TEER monitoring in mature well-differentiated TC7 cell monolayers

In the present study, we used mature well-differentiated TC7 cells showing the highest uptake levels as possible. We have exposed differentiated cells to Cd from day 21 to day 31 and then determined at which day of culture cells show the highest uptake levels. The rationale for choosing the 21 to 31-days period of culture was based on previous studies showing high differentiation level at 21 days (Jumarie et Malo, 1991). However, to what extent Cd uptake may vary in older cultures had to be determined. Because we studied the transepithelial transport of Cd, it was also important to select cell monolayers with a relatively high TEER value indicating well-formed tight junctions (Fig. 6.1).

It has been reported that high concentrations of Cd may cause: 1) cytotoxicity; 2) a decrease in TEER caused by a disruption of tight junctions leading to increased Cd transport through the paracellular pathways; 3) necrosis in some extreme situations (Andersen *et al.*, 1988). These effects observed on the intestinal epithelium were found to be concentration- and time-dependent occurring at a concentration of 5 μM Cd following a 4-h period of exposure (Duizer *et al.*, 1999). TEER is a more sensitive and early-response marker of Cd cytotoxicity than intracellular potassium concentration, lactate dehydrogenase leakage (Prozialeck and Lamar, 1993) or cell detachment and viability (Prozialeck and Niewenhuis, 1991). We have measured TEER to determine whether long-term exposure to 0.5 μM ^{109}Cd may induce tight junction disruption, and consequently Cd leakage through the paracellular pathway, which would have led to over estimate transcellular transport. Our results show that a 8-h exposure to 0.5 μM ^{109}Cd did not affect the integrity of 21-days-old TC7 cell monolayers (Fig. 6.2). In fact, TEER tend to slightly decrease between 0 – 15 min and then increase and remain stable from 4 to 8 h. We did not find an explanation for this increase but we already have observe the same increase in TEER over the same period of time in other studies (unpublished results).

Considering these data, we have performed our study on 21-days-old monolayers because: 1) they presented the highest uptake values, 2) monolayer integrity did not increase

significantly after 21 days in culture, 3) exposure to $0.5 \mu\text{M}$ ^{109}Cd up to 8 h did not significantly affect cell monolayers integrity.

Time course of cellular accumulation and transepithelial transport with respect to the side of exposure in pre- and post-confluent cells

As shown in Fig. 6.3, Cd transport varies considerably with the cell's differentiation status. In post-confluent cells, BL A_{max} value was twice the AP A_{max} (108 ± 18 and 50 ± 29 pmol/mg protein, respectively). Jumarie *et al.*, (1999) have reported that the BL accumulation of Cd was more important compared to the AP accumulation in post-confluent cells. Our observation is in accordance with their data but here we also demonstrate that this difference in Cd accumulation was not observed in pre-confluent cells. Indeed, in pre-confluent cells, A_{max} are similar (90 ± 13 pmol/mg protein for the AP side and 98 ± 25 pmol/mg protein for the BL side). Then differences observed in 21-days-old cells are a result of decreased AP uptake rather than increased BL uptake as a function of days in culture.

The Cd leakage observed in pre-confluent cells is probably due to immatures tight junctions which are not totally impermeable to Cd thus allowing the metal to be rapidly transported through paracellular pathways. Lower transepithelial transport values observed in post-confluent cells demonstrate that in mature enterocyte, Cd does not appreciably pass through the tight junctions. It is well known that transepithelial transport of Cd requires passage through the cell monolayer. In a previous study, Jumarie *et al.* (1997) demonstrated that the rate-limiting step in Cd accumulation was the process of uptake. Then, in other studies, they also demonstrated that saturation of intracellular binding sites was necessary before appreciable transepithelial transport can take place (Jumarie *et al.*, 1999). Therefore, we could expect that higher uptake may lead to saturation of intracellular binding site and then, to higher transepithelial transport. In the present study, the much higher BL uptake compared to AP may be responsible for the significant transport in the BL-to-AP direction whereas transepithelial transport from the AP side remained negligible in 21-days-old cells (Fig.6.3). Tight junctions are impermeable in mature enterocyte (Pranav *et al.*, 2006) and our cultures show high TEER values (Fig. 6.1). Moreover, because Cd concentration in the AP

medium remained negligible compared to the BL concentration of exposure, we conclude that transepithelial transport of Cd in post-confluent cells involves mainly transcellular pathways.

BL cellular accumulation and transepithelial transport of Cd under inorganic conditions

To our best knowledge, the impact of metal speciation on the BL uptake of Cd at various external pH (pH_{out}) has never been studied. To experimentally increase the level of the free aqua ion present in the exposure medium, Cl^- was changed for NO_3^- which does not complex Cd as much as Cl^- . Cd speciation was estimated using MINEQL⁺ calculations which predict metal chemical species at thermodynamic equilibrium. Note that although MINEQL⁺ calculations predict the formation of octavite species at pH 8.5 in a NO_3^- medium, no precipitate was observed at the time of experiment: the time needed to reach the thermodynamic equilibrium is not provided in MINEQL⁺ outputs and octavite species formation may take much longer times not reach during our experiments. At pH 7.4, no significant differences were observed between the 3-min uptake levels measured in both media (Fig. 6.6). Significant differences were only observed with variation in pH_{out} in the Cl^- medium showing increase in Cd uptake under basic pH conditions. OCT1 transporter is known to be stimulated at basic pH (Koepsell *et al.*, 2003), thus the increased cellular uptake at pH 8.5 suggest the involvement of OCT1 in the uptake of CdCl_n^{2-n} . Cd uptake in the NO_3^- medium was not significantly different at different pH_{out} suggesting that uptake of Cd^{2+} is not sensitive to pH_{out} . Interestingly, even if $[\text{Cd}^{2+}]$ is 6 times higher in the NO_3^- medium compare to Cl^- , uptake levels did not increase as much suggesting that Cd uptake is not entirely related to Cd^{2+} species. Note that the uptake of Cd^{2+} could also be saturated thus no increase in uptake levels could be observed.

Cadmium interactions with Ca, Fe and Zn were studied at pH_{out} 7.4 and 8.5 to estimate the part of Cd uptake sensitive to pH that may be subjected to metal interactions (Fig. 6 7). Curiously, ^{109}Cd uptake was lower in the absence of Ca even if Jumarie *et al.* (1997) pointed out that Cd is most likely transported by a carrier-type protein unrelated to Ca absorption. Pham *et al.* (2004) reported observations similar to ours showing lower Cd uptake

levels in the absence of Ca in primary cultures of rat hepatocytes. Based on these results, it may be postulated that part of Cd uptake could occur via some co-transport mechanisms involving Ca. The 55 % decrease in Cd uptake observed in Ca-free medium at pH 7.4 is in accordance with what has been observed by Pham *et al.* (2004) in rat hepatocytes. The presence of 100 μ M Zn inhibited almost completely the specific uptake of ^{109}Cd under both pH conditions whereas the smaller inhibitory effect of Fe was pH-dependent. Higher Fe concentrations could possibly lead to higher levels of inhibition. However it appears clearly that Zn is a more potent inhibitor of Cd uptake. Because 100 μ M Zn abolished the all of the specific uptake, the use of Zn-Fe mixtures could not reveal possible additive effects between Zn and Fe, if any. Lower Zn concentrations combined with higher Fe concentrations could be used to reveal possible additive effects between both metals.

Uptake by OCT1 is known to be stimulated with basic pH (Koepsell *et al.*, 2003) and our results show that ^{109}Cd uptake is stimulated at pH 8.5. Therefore, we have tested the possible effect of well-known inhibitors under stimulatory conditions, i.e. pH 8.5, to optimize Cd uptake possibly related to OCT1. Also because the contribution of OCT1 in the total uptake of Cd appeared to be not as high, we have performed these experiments over a 1-h period of cell's exposure to maximize the uptake data and then discrimination between possible inhibitors effects. TEA and MPP⁺, two model substrates of OCT1 (Busch *et al.*, 1998; Gorboulev *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1998, 1999; Wu *et al.*, 2000) and cimetidine, a H₂ histamine receptor antagonist which is also known to be transported by rat OCT1 (Koepsell, *et al.*, 2003), were used as competitive inhibitors for OCT1. Figure 6.8A shows a 29 % stimulation of ^{109}Cd uptake by increasing pH 7.4 to 8.5 which suggest the involvement of OCT1 in Cd uptake. We observed a slight decrease in ^{109}Cd uptake in the presence of TEA but not MPP⁺. Note that Bleasby *et al.* (2000) reported that MPP⁺ is not transported by OCT1 in Caco-2 cells which may explain the lack of inhibition. TEA did not inhibit completely the part of Cd uptake that was stimulated at pH 8.5 suggesting that Cd affinity for the transporter may be higher compared to TEA. The most potent inhibitor was cimetidine which inhibited by 37 % Cd accumulation and completely abolished the stimulatory effect of pH 8.5. Again, the higher inhibition by cimetidine may suggest a higher affinity compared to TEA. Indeed, studies from Zhang *et al.*, (1999) reported a K_m of 229 μ M for TEA uptake and a K_i of 166

μM for the inhibition of TEA uptake by cimetidine, estimated at $5 \mu\text{M}$ TEA and assuming a competitive mechanism of inhibition. Note that cimetidine is also known to bind Fe (Lambat, Limson and Daya, 2002) and therefore could possibly bind Cd. Then, lower uptake levels would be the result of Cd complexation by cimetidine in the exposure medium.

Although a 29 % increase was observed in the cellular BL accumulation of Cd by increasing pH_{out} from 7.4 to 8.5 (Fig. 6.8A), no parallel increase in the transepithelial transport was measured (Fig. 6.8B). This observation is in accordance with our previous conclusion: saturation of intracellular binding sites is necessary before considerable transepithelial transport can take place. Saturation of binding sites is not completed during 1 h thus the transepithelial transport in the BL-to-AP direction remains negligible. Therefore for practical reasons, in the second series of experiments investigating the cellular AP efflux of Cd, cells were loaded from the AP side.

BL cellular accumulation of Cd under organic conditions

After entering systemic circulation, Cd binds to plasma proteins, mainly albumin (Alb), because of its high affinity for the Alb sulfhydryl groups (Nordberg *et al.*, 1985). It is likely that blood Cd is mainly present bound to Alb and traces of metallothionein (Foulkes and Blanck, 1990; Roberts and Clark, 1988). It is generally believed that metal complexation with organic ligands such as Alb would decrease metal uptake as a result of lower unbound metal levels. However, this assumption does not take into consideration that organic metal complexes might also be transported through the cellular membrane. For this reason, we investigated whether complexation to Alb modify the BL uptake in the TC7 cells. A fixed total concentration of $0.5 \mu\text{M}$ ^{109}Cd was used with increasing concentrations of BSA to enhanced complexation with BSA which lead to lower levels of inorganic Cd species (Fig. 6.9). The 3-min uptake remained unchanged whatever the presence of increasing concentrations of BSA. The results may be compared to the theoretical decrease in Cd accumulation that would be observed if only inorganic species were transported. Comparison between theoretical values and experimental data clearly show that the uptake of ^{109}Cd in the presence of BSA did not decrease, suggesting that Cd bound to BSA is available for uptake at

the BL side of the TC7 cells. Because BSA-Cd complex may dissociate before being transported through the membrane, our results do not demonstrate for sure that BSA-Cd complexes are taken up. This would require experiments conducted with double labeling BSA-Cd.

Because our data suggest that BL uptake of Cd in the TC7 cells is not exclusively related to the levels of the inorganic metal species, additional experiments investigating the possible involvement of BSA-Cd were conducted to test endocytosis processes. Indeed, Alb is known to be transported by endocytosis (Besterman and Low, 1983; Gekle, *et al.*, 1997). Figure 6.10 shows that chlorpromazine, an inhibitor of calveolin-dependent endocytosis (Phonphok and Rosenthal, 1991; Wang Rothberg and Anderson, 1993) and methyl- β -cyclodextrine, an inhibitor of clathrin-dependent endocytosis (Rodal *et al.*, 1999), did not significantly modify the accumulation levels. Hence, in the presence of 300 μ M BSA, Cd uptake is not related to calveolin- nor clathrin-dependent endocytosis. These results may favour the hypothesis that Cd bound to BSA remains available for uptake after dissociation since the BSA-Cd complex is unlikely to be taken up. Surprisingly, Cd uptake measured in the absence of BSA was enhanced in the presence of inhibitors. Because methyl- β -cyclodextrine depletes cholesterol from the cell membrane, cell permeability may be enhanced and therefore higher Cd uptake would be observed. This enhancement could hide inhibition of Cd uptake via endocytosis.

Cellular apical Cd efflux

Because cellular AP efflux is the second step in the overall process of transepithelial transport of Cd in the BL-to-AP direction (which mainly involves transcellular pathways), the kinetic of tracer efflux was also studied. Moreover, because of the high cellular capacity to bind Cd, which limits the rate of the transcellular pathways (Fig. 6.3D and Jumarie *et al.*, 1999), cell's pre-incubation was on the AP side instead of the BL side. Results shown in Fig. 6.11A demonstrate that most of the tracer accumulated in the TC7 cells over the 2-h pre-incubation remains into the cells. Cellular efflux is a rapid process which reaches a plateau. Although cellular ATP levels were sufficient for ATP-dependent mechanisms of efflux to

occur over 30 min, ^{109}Cd release never exceeded about 20 % of the initial cellular accumulation levels. These results suggest that only small part of Cd accumulated into the cells is irreversible, which is in accordance with the results obtained by Jumarie *et al.* (1999). In the presence of unlabeled Cd in the efflux medium (Fig. 6.11B), both rate and amplitude of ^{109}Cd release increased, suggesting the involvement of an exchange mechanism. Since higher ^{109}Cd levels were recovered in the Cd-containing medium, lower cellular ^{109}Cd contents are expected at plateau of efflux. This could not be observed in the kinetic studies (Fig. 6.11A), but one-time points measurements clearly reveal lower cellular ^{109}Cd contents in the presence of unlabeled Cd in the efflux medium (21.2 ± 3.9 vs. 26.3 ± 2.8 pmol/mg protein) (Fig. 6.12A).

MDR1-like proteins have been shown to be involved in metal resistance in nematode (Broeks *et al.*, 1996), yeast (Szczypka *et al.*, 1994) and rats (Dijkstra *et al.*, 1996) and MRP2 has been shown to be involved in excretion of GSH-conjugated metal in the liver (Sugawara *et al.*, 1998; Borst *et al.*, 1999). Therefore, we have investigated the possible involvement of these transporters in the AP efflux of Cd using verapamil and probenecid, two inhibitors of MDR1 and MRP2 respectively (Gerk et Vore, 2002; Scheffer et Scheffer, 2002; Pauli-Magnus *et al.*, 2000; Weaver *et al.*, 1993). Our results show a decrease in Cd efflux in the presence of verapamil and probenecid, suggesting that Cd efflux is mediated in part by MDR1 and MRP2, and also by some exchange mechanisms. MDR1 and MRP2 are not expected to be involved in the part of AP efflux of ^{109}Cd that is stimulated by Cd in the efflux medium (this mechanism is related to exchange transporters whereas MDR1 and MRP2 are strict efflux pumps). Surprisingly, inhibition by verapamil and probenecid was higher in the presence of Cd in the efflux medium. This observation could suggest that the exchange mechanism involved in Cd efflux may be sensitive to both inhibitors. However, this need to be clarified in future studies.

In conclusion we have shown that OCT1 at the BL side and MDR1 and MRP2 at the AP side may be involved in the transepithelial transport of Cd in the BL-to-AP direction in well-differentiated TC7 cells. Moreover, our results have revealed the involvement of an exchange mechanism in the AP efflux of Cd. The contribution of

the intestine in Cd excretion following chronic contamination clearly deserves further investigation.

6.6 References

- Adamsson E., Piscator M., Nogawa K. 1979. Pulmonary and gastrointestinal exposure to cadmium oxide dust in a battery factory. *Environ Health Perspect* 28:219-222.
- Andersen, O., Nielsen, J.B., Svendsen, P. 1988. Oral cadmium chloride intoxication in mice: effects of dose on tissues damage, intestinal absorption and relative organ distribution. *Toxicology* 48:225-236.
- ATSDR, (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 1999. Toxicological profile for cadmium, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Services, 397 p.
- Besterman, J. M., Low, R. B. 1983. Endocytosis: a review of mechanisms and plasma membrane dynamics, *Biochem. J.*, 210, 1-13.
- Bleasby, K., Chauhan S., Brown, C.D.A.. 2000. Characterization of MPP⁺ secretion across human intestinal Caco-2 cell monolayers: role of P-glycoprotein and a novel Na⁺-dependent organic cation transport mechanism *British Journal of Pharmacology* 129, 619-625.
- Borst, P., Evers, R., Kool, M., Wijnholds, J. 1999. The multidrug resistance protein family, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, Volume 1461, Issue 2, p. 347-357
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 72: 248-254
- Broeks, A., Janssen, H. W., Calafat, J., Plasterk, J. H. 1996. A P-glycoprotein protects *Caenorhabditis elegans* against natural toxins, *EMBO J.* 1; 14(9): 1858-1866.
- Buchet J.P., Lauwerys R., Roels H. 1990. Renal effects of cadmium body burden of the general population. *Lancet* 336:699-702.
- Busch, A. E., Karbach, U., Miska, D. Gorboulev, V., Akhoundova, A., Volk, C., Arndt, P., Ulzheimer, J.C., Sonders, M.S., Baumann, C., Waldegger, S., Lang, F., Koepsell, H. 1998. Human Neurons Express the Polyspecific Cation Transporter hOCT2, Which Translocates Monoamine Neurotransmitters, Amantadine, and Memantine, *Molecular pharmacology*, Vol. 54, Issue 2, 342-352.
- Chantret, I, Rodolosse, A., Barbat, A., Dussaulx, E., Brot-Laroche, E, Zweibaum, A., Rousset, M. 1994. Differential expression of sucrase isomaltase in clones isolated from early and late passages of the cell line Caco-2: evidence for glucose dependant negative regulation. *J Cell Sci* 107: 213-225.
- Dijkstra, M., Havinga, R., Vonk, R.J., Kuipers, F. 1996. Bile secretion of cadmium. Silver, zinc and copper in the rat. Involvement of various transport systems, *Life Sciences*, Vol. 59, No. 1237-1246.

Duizer, E., Gilde, A. J., Versantvoort C. H. M., Groten, J. P. 1999. Effects of Cadmium Chloride on the Paracellular Barrier Function of Intestinal Epithelial Cell Lines, *Toxicology and Applied Pharmacology* Volume 155, Issue 2, p. 117-126

Fortin, C., Campbell, P. G. C. 2000. Silver uptake by the green alga *Chlamydomonas Reinhardtii* in relation to chemical speciation: Influence of chloride. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 2769–2778.

Foulkes, E. C., and Blanck, S. 1990. Acute cadmium uptake by rabbit kidneys: Mechanism and effects. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 102, 464–473.

Friberg, L., Elinder, C.G., Kjellstrom, T., Nordberg, G.F. 1985. Cadmium and health. A toxicological and epidemiological appraisal. Vol. 1. Boca Raton, FL: CRC Press.

Gekle, M., Mildenerberger, S., Freudinger, R., Schwerdt, G., Silbernagl, S. 1997. Albumin endocytosis in OK cells: dependence on actin and microtubules and regulation by protein kinases, *Am J Physiol Renal Physiol* 272: F668-F677.

Gerk, P.M., Vore, M. 2002. Regulation of expression of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) and its role in drug disposition. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302, pp. 407–415.

Gorboulev, V., Ulzheimer J.C., Akhoundova, A., Ulzheimer-Teuber, I., Karbach, U., Quester, S., Baumann, C., Lang, F., Busch, A.E., Koepsell, H. 1997. Cloning and characterization of two human polyspecific organic cation transporters. *DNA and Cell Biology* 16:871-881.

Hauri, H.P., Sterchi, E.E., Bienz, D., Fransen, M.A., Marxer, A. 1985. Expression of intracellular transport of microvillus membrane hydrolases in human intestinal epithelial cells. *J Cell Biol.* 101: 838-51.

Hoffmann, U., Kroemer, H. K. 2004. The ABC Transporters MDR1 and MRP2: Multiple Functions in Disposition of Xenobiotics and Drug Resistance, *Drug Metabolism Reviews*, Volume 36, Issue 3 & 4 pages 669 - 701

Howell, S., Kenny, A. J., Turner A.J. 1992. A survey of membrane peptidases in two human colonic cell lines, Caco-2 and HT-29. *Biochem J*; 284:595-601.

Huet C., Sahuquillo-Merino, C., Coudrier, E., Louvard, D. 1987. Absorptive and mucus-secreting subclones isolated from a multipotent intestinal cell line (HT-29) provide new models for cell polarity and terminal differentiation. *J Cell Biol*; 105:345-57.

Jumarie, C., Campbell, P.G.C., Berteloot, A., Houde, M., Denizau, F. 1997. Caco-2 cell line used as an in vitro model to study cadmium accumulation in intestinal epithelial cells. *J Membr Biol* 158:31–48.

- Jumarie, C., Campbell, P.G.C., Houde, M., Denizeau, F. 1999. Evidence for an Intracellular Barrier to Cadmium Transport Through Caco-2 Cell Monolayers, *J. Cell. Physiol.* 180:285–297.
- Jumarie, C., Malo, C. 1991. Caco-2 cells cultured in serum-free medium as a model for the study of enterocytic differentiation in vitro, *Journal of cellular*, vol. 149, n°1, pp. 24-33
- Kjellstrom T., Nordberg G.F. 1978. A kinetic model of cadmium metabolism in the human being. *Environ Res* 16:248-269.
- Koepsell, H., Endou, H. 2004. The SLC22 drug transporter family, *Eur J Physiol* 447: 666-676.
- Koepsell, H., Schmitt, B.M., Gorboulev, V. 2003. Organism cation transporters, *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 150: 36-90.
- Lambat, Z., Limson, J.L., Daya S. 2002. Cimetidine: antioxidant and metal-binding properties, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, Volume 54, Number 12, 1 pp. 1681-1686(6).
- Nordberg, G. F., Kjellstrom, T., Nordberg, M. 1985. Kinetics and metabolism. In *Cadmium and Health: A Toxicological and Epidemiological Appraisal: Exposure, Dose, and Metabolism* (L. Friberg, C. G. Elinder, T. Kjellstrom, and G. F. Nordberg, Eds.), pp. 103–178, Vol. 1. CRC Press, Boca Raton, FL
- Pauli-Magnus, C., von Richter, O., Burk, O., Ziegler, A., Mettang, T. 2000. Characterization of the major metabolites of verapamil as substrates and inhibitors of P-glycoprotein. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 293:376--82
- Pham, T.N., Segui, J.A., Fortin, C., Campbell, P.G., Denizeau, F., Jumarie C. 2004. Cadmium uptake in rat hepatocytes in relation to speciation and to complexation with metallothionein and albumin. *Journal of Cellular Physiology*, 201: 320-330.
- Phonphok, Y., Rosenthal, K. S., 1991. Stabilization of clathrin coated vesicles by amantadine, tromantadine and other hydrophobic amines. *FEBS Lett* 281, 188–190.
- Pinot, F., Freps, S.E., Bachelet, M., Hainaut, P., Bakonyi, M., Polla, B.S. 2000. Cadmium in the environment: Sources mechanisms of biotoxicity and biomarkers. *Rev Environ. Health*, 15, 299-323.
- Pinto, M., Robine-Leon, S., Appay, M.D. 1983. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol Cell*;47: 323-30.
- Pranav, S., Viral, J., Tamishraha, B., Ambikanandan, M. 2006. Role of Caco-2 Cell Monolayers in Prediction of Intestinal Drug Absorption, *Biotechnology Progress* 22:186-198.

Prozialeck, W. C., Lamar, P. C. 1993. Surface binding and uptake of cadmium (Cd^{2+}) by LLC-PK1 cells on permeable membrane supports. *Arch. Toxicol.* 67, 113–119.

Prozialeck, W. C., Niewenhuis, R. J. 1991. Cadmium (Cd^{2+}) disrupts Ca^{2+} -dependent cell-cell junctions and alters the pattern of E-cadherin immunofluorescence in LLC-PK1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181, 1118–1124.

Rahola T., Aaran R.K., Miettinen J.K. 1973. Retention and elimination of ^{115}mCd in man. In: *Health physics problems of internal contamination*. Budapest: Akademia 213-218.

Roberts, C. A., Clark, J. M. 1988. In vivo depression of reserve albumin binding capacity by cadmium: A preliminary evaluation. *Life Sci.* 42, 1369–1374.

Rodal, S.K., Skretting, G., Garred, O., Vilhardt, F., van Deurs, B., Sandvig, K. 1999. Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Mol Biol Cell* 10: 961-974.

Rousset, M., Chantret, I., Darmoul, D. 1989. Reversible forskolin induced impairment of sucrase isomaltase mRNA levels, biosynthesis and transport to the brush border membrane in Caco-2 cells. *J Cell Physiol.*; 141:627-35.

Rusch, G.M., O'Grodnick, J.S., Rinehart, W.E. 1986. Acute inhalation study in rat of comparative uptake, distribution and excretion of different cadmium containing materials. *Am Ind Hyg Assoc* 47:754-763.

Scheffer, G.L., Scheper, R.J. 2002. Drug resistance molecules: lessons from oncology. *Novartis. Found. Symp.* 243, pp. 19–31.

Shaikh, Z. A., Blazka, M. E., Endo, T. 1995. Metal Transport in Cells: Cadmium Uptake by Rat Hepatocytes and Renal Cortical Epithelial Cells, *Environ Health Perspect* 103 (Suppl 1):73-75

Sugawara, N., Lai, Y-R., Sugawara, C., Arizono, K. 1998. Decreased hepatobiliary secretion of inorganic mercury, its deposition and toxicity in the Eisai hyperbilirubinemic rat with no hepatic canalicular organic anion transporter, *Volume 126, Issue 1, 20, p. 23-31*

Szczycka, M.S., Wemmie, J.A., Moye-Rowley, W.S., Thiele, D. J. 1994. A Yeast Metal Resistance Protein Similar to Human Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) and Multidrug Resistance-associated Protein, *THEJ journal of biological chemistry*, Vol. 269, No. 36, pp. 22853-22857.

Traber, P.G. 1994. Differentiation of intestinal epithelial cells: lessons from the study of intestine-specific gene expression. *J. Lab. Clin. Med.* 128, 467–477.

Wang, L., H., Rothberg, K. G., Anderson, R. G. W. 1993. Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *J Cell Biol* 123, 1107–1117.

- Weaver J.L., Szabo G. Jr, Pine P.S., Gottesman M.M., Goldenberg S., Aszalos A. 1993. The effect of ion channel blockers, immunosuppressive agents, and other drugs on the activity of the multi-drug transporter. *Int. J. Cancer* 54:456--61
- Wu, X., Huang, W., Ganapathy, M.E., Wang, H., Kekuda, R., Conway, S.J., Leibach, F.H., Ganapathy, V. 2000. Structure, function and regional distribution of the organic cation transporter OCT1 in the kidney. *American journal of physiology* 279, 449-458.
- Zalups, R., Ahmad, S. 2003. Molecular handling of cadmium in transporting epithelia, *Toxicology and applied pharmacology* 186 163-188.
- Zhang, L., Brett, C., M., lacmon, K. M. 1998. Role of organic cation transporter in drug absorption and elimination, *Annual review of pharmacology and toxicology*, vol. 38, pp. 431-460
- Zhang, L., Gorset, W., Dresser, M.J., Giacomini, K.M. 1999. The interaction of n-tetraalkylammonium compounds with a human organic cation transporter, hOCT1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 288:1192--98
- Zweibaum, A., Pinto, M., Chevalier, G. 1985. Enterocytic differentiation of a subpopulation of the human colon tumor cell line HL-29 selected for growth in sugar-free medium and its inhibition by glucose. *J Cell Physiol*; 122:1-9.

6.7 Legends to figures

Figure 6.1: Basolateral cellular accumulation of $0.5 \mu\text{M } ^{109}\text{Cd}$ (filled circles) and monitoring of formation of TC7 cells monolayer grown on filters by measuring the TEER (open circles) as described in the text following cells maturation. Values shown are means \pm SEM evaluated on three different cell cultures.

Figure 6.2: Integrity of 21-days old TC7 cells monolayers grown on filters and exposed over 8 h to $0.5 \mu\text{M } ^{109}\text{Cd}$. TEER was measured as described in the text. Values shown are means \pm SEM evaluated on three different cell cultures.

Figure 6.3: Time course of cellular accumulation and transepithelial transport of $0.5 \mu\text{M } ^{109}\text{Cd}$ in 10- (A, C) and 21- (B, D) days-old TC7 cell monolayers grown on filters. Cells were exposed to tracer at the AP (open symbols) or at the BL (filled symbols) side. Cellular levels of ^{109}Cd and total amounts of tracer recovered in the opposite chamber inserts were measured as described in the text. Values shown are means \pm SEM evaluated on three different cell cultures. For the cellular accumulation, the lines shown are the best-fit curves through the data points, as obtained according to the first-order rate Eq. (6.1) in the text. For the transepithelial transport the lines shown are the best-fit lines through the data points, as obtained according to the linear Eq. (6.2) in the text.

Figure 6.4: Short-term cellular accumulation of $0.5 \mu\text{M } ^{109}\text{Cd}$ in 21-days-old TC7 cell monolayers grown on filters. Cells were exposed to tracer at the BL side. Cellular levels of ^{109}Cd were measured as described in the text. Values shown are means \pm SEM evaluated on three different cell cultures. The lines shown are the best-fit curves through the data points, as obtained according to the linear Eq. (6.2) in the text.

Figure 6.5: Effect of an excess unlabeled Cd in the uptake medium on the short-term (3 min) cellular accumulation of $0.5 \mu\text{M } ^{109}\text{Cd}$. Twenty-one-days old TC7 cells grown on filters were exposed to tracer at the BL side in the absence (clear column) and in the presence of $100 \mu\text{M}$ Cd (dashed column). Values shown are means \pm SEM evaluated on three different cell cultures. * indicates significant differences ($P \leq 0.05$) compared to the control value.

Figure 6.6: Effect of metal speciation on the short-term (3 min) cellular accumulation of $0.5 \mu\text{M } ^{109}\text{Cd}$ in 21-days-old TC7 cells grown on filters. Cells were exposed to tracer in chloride or nitrate medium at the BL side in the absence (clear column) and in the presence of $100 \mu\text{M}$ Cd (dashed columns). Values shown are means \pm SEM evaluated on three different cell cultures. Columns with different letters are significantly different ($P \leq 0.05$).

Figure 6.7: Effect of metal interactions on the short-term (3 min) cellular accumulation of $0.5 \mu\text{M } ^{109}\text{Cd}$. Twenty-one-days old TC7 cells grown on filters were exposed to tracer at the BL side in chloride transport medium in the absence or in the presence of 5 mM Ca, $100 \mu\text{M}$ Fe and $100 \mu\text{M}$ Zn at pH 7.4 (clear column) and pH 8.5 (dashed column). Values shown are means \pm SEM evaluated on three different cell cultures. * and # indicate significant differences ($P \leq 0.05$) compared to the control value at pH 7.4 and pH 8.5, respectively.

Figure 6.8: Cellular accumulation (A) and transepithelial transport (B) of $0.5 \mu\text{M } ^{109}\text{Cd}$ in the presence and in the absence of $500 \mu\text{M}$ of three OCT1 inhibitors in the chloride medium over a 1-h exposure. Transport media containing inhibitors were adjusted to pH 8.5. Twenty-one-days old TC7 cells were exposed to tracer at the BL side. * and # indicate significant differences ($P \leq 0.05$) between pH 7.4 and pH 8.5. Values shown are means \pm SEM evaluated on three different cultures.

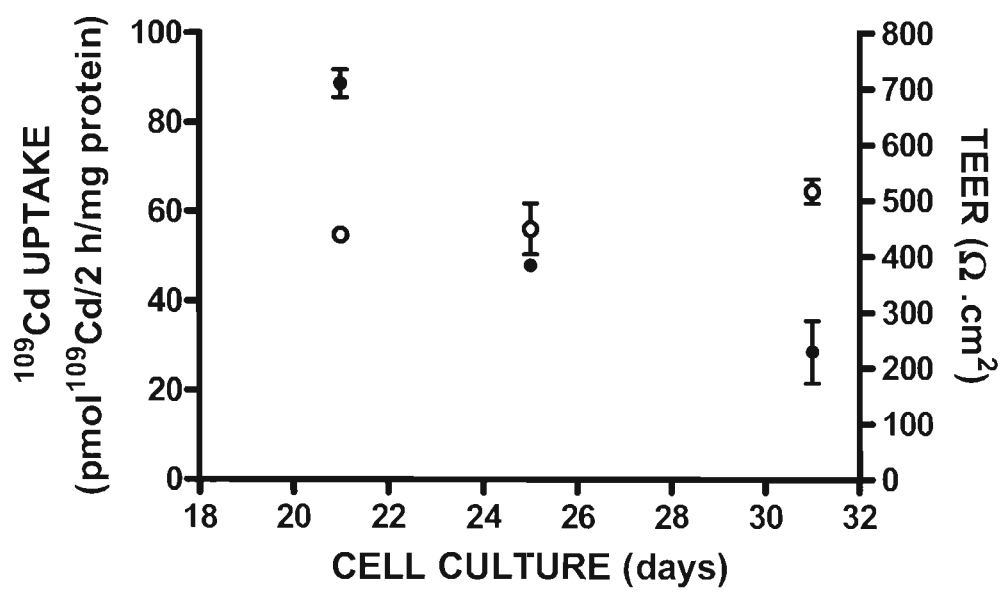
Figure 6.9: Effect of Cd complexation by albumin on the short-term (3 min) BL cellular accumulation of $0.5 \mu\text{M } ^{109}\text{Cd}$ (dashed column) on 21-day-old TC7 cells grown on filters. The decrease in the concentration of total inorganic metal species, resulting from increasing ^{109}Cd complexation, has been estimated in Table 6.4; the theoretical corresponding tracer accumulation related to the residual levels of inorganic ^{109}Cd has been estimated (open columns). TC7 cells were exposed to tracer at the BL side in the presence of increasing concentrations of albumin. * indicate significant differences ($P \leq 0.05$) compared to the control value. Values shown are means \pm SEM evaluated on three different cultures.

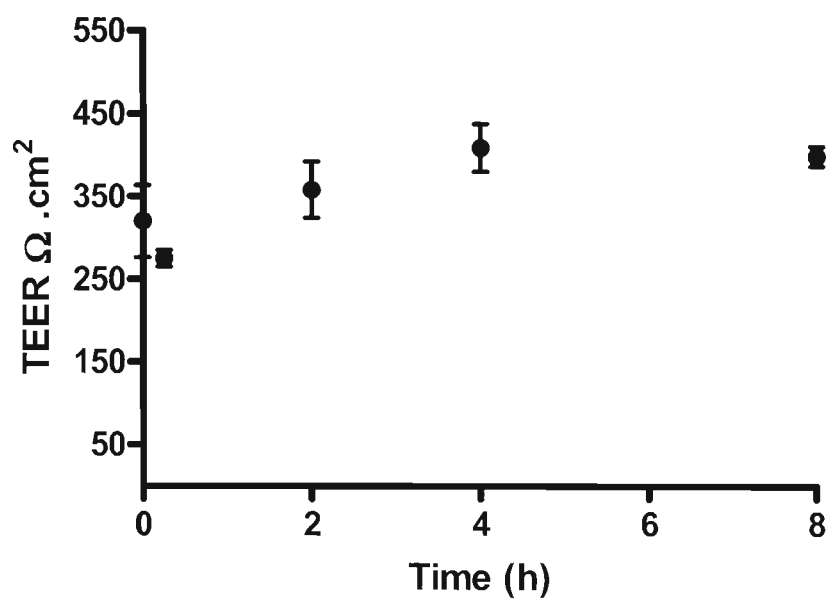
Figure 6.10: Effect of two endocytosis inhibitors, $250 \mu\text{M}$ chlorpromazine (dashed columns) and 5 mM methyl B cyclodextrine (dotted column), on the short-term (3 min) BL cellular accumulation of $0.5 \mu\text{M } ^{109}\text{Cd}$ in the absence or presence of $300 \mu\text{M}$ albumin. Experiments

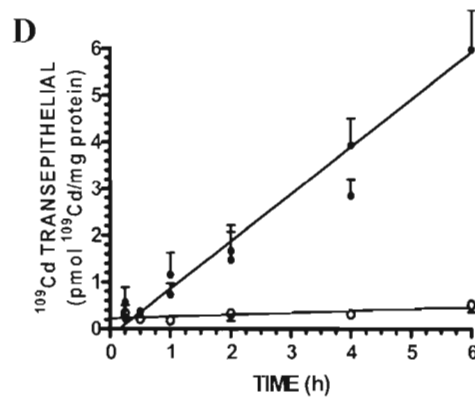
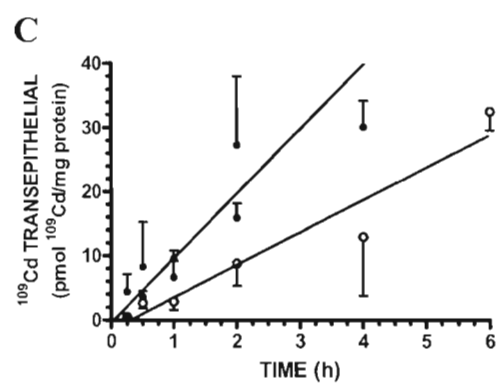
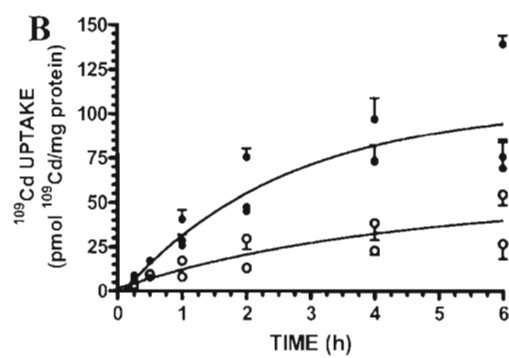
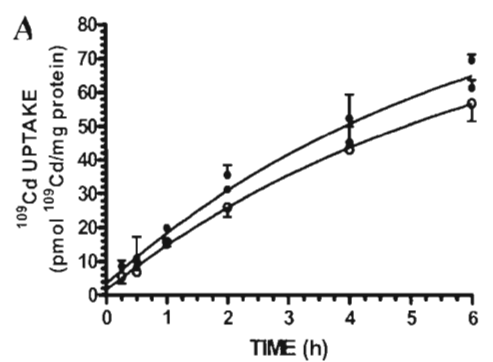
were performed on 21-days old TC7 cells grown on filters. Values shown are means \pm SEM evaluated on three different cultures.

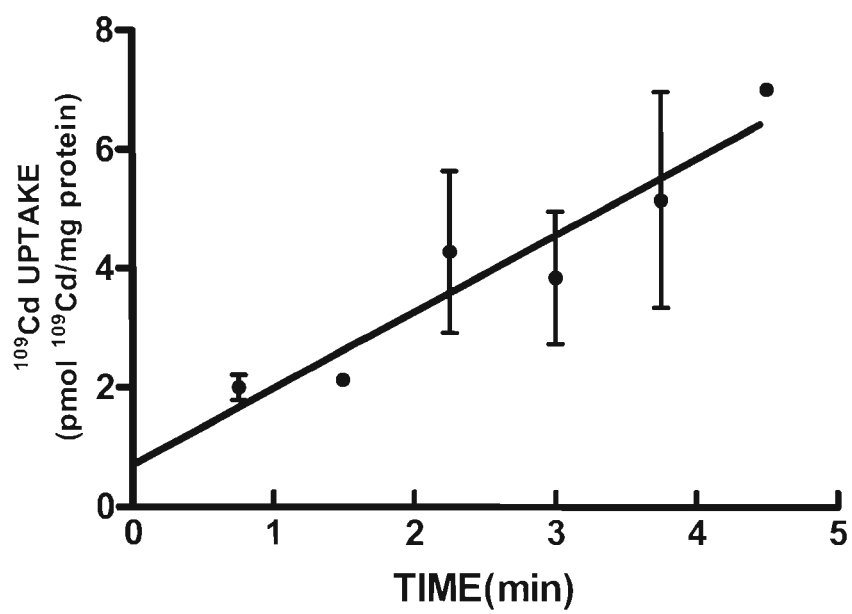
Figure 6.11: Kinetics of ^{109}Cd efflux from 21-days old TC7 cells pre-exposed to $0.5\ \mu\text{M}$ ^{109}Cd at the AP side for 2 h. Residual cellular accumulation (A) and cellular ^{109}Cd release (B) in the presence (filled circle) or the absence (open circle) of $100\ \mu\text{M}$ unlabeled Cd in the efflux medium were recorded as described in the text. Values shown are means \pm SEM evaluated on three different cultures. The lines shown are the best-fit curves through the data points, as obtained according to the first-order decay Eq. (6.3) (A) or the first-order rate Eq. (6.4) (B) in the text.

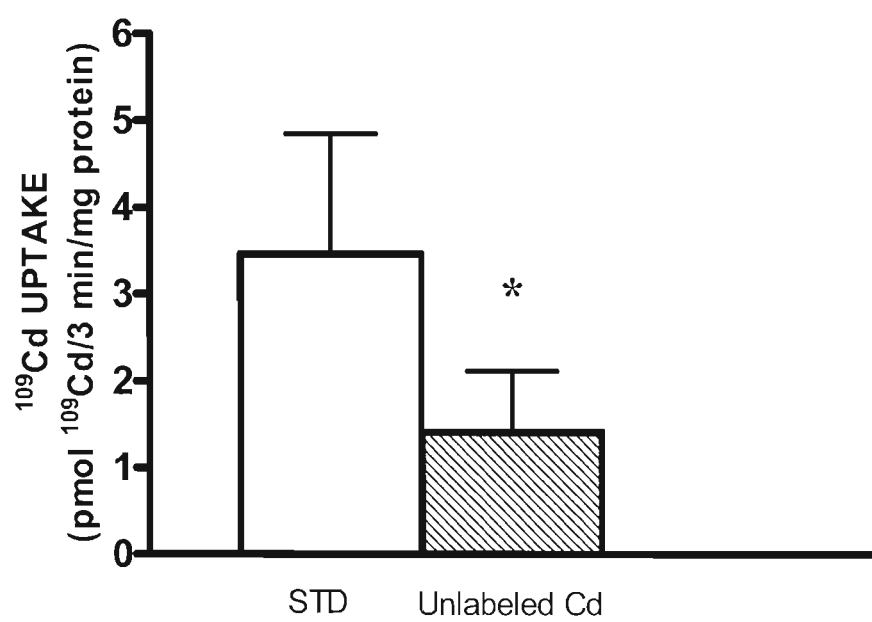
Figure 6.12: Cd efflux in the presence or the absence of $250\ \mu\text{M}$ verapamil and $500\ \mu\text{M}$ probenecid from 21-days old TC7 cells pre-exposed to $0.5\ \mu\text{M}$ ^{109}Cd on the AP side for 2 h. Residual cellular accumulation (A) and cellular ^{109}Cd release (B) in the presence (filled column) or the absence (open column) of $100\ \mu\text{M}$ unlabeled Cd in the efflux media were recorded at 30 min of efflux as described in the text. Cellular accumulation at zero min of efflux is represented by the horizontal bar. Values shown are means \pm SEM evaluated on three different cultures.

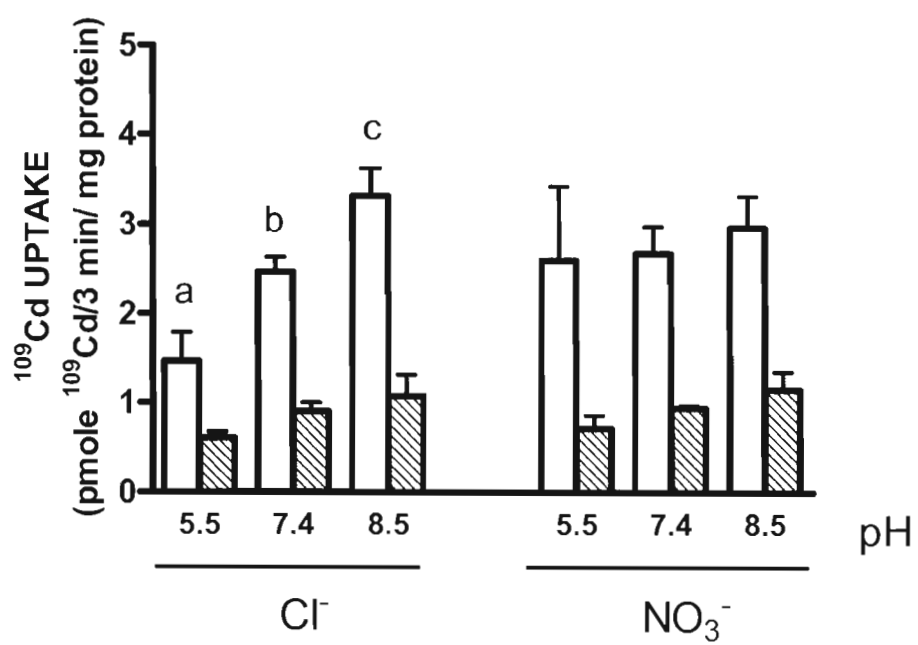


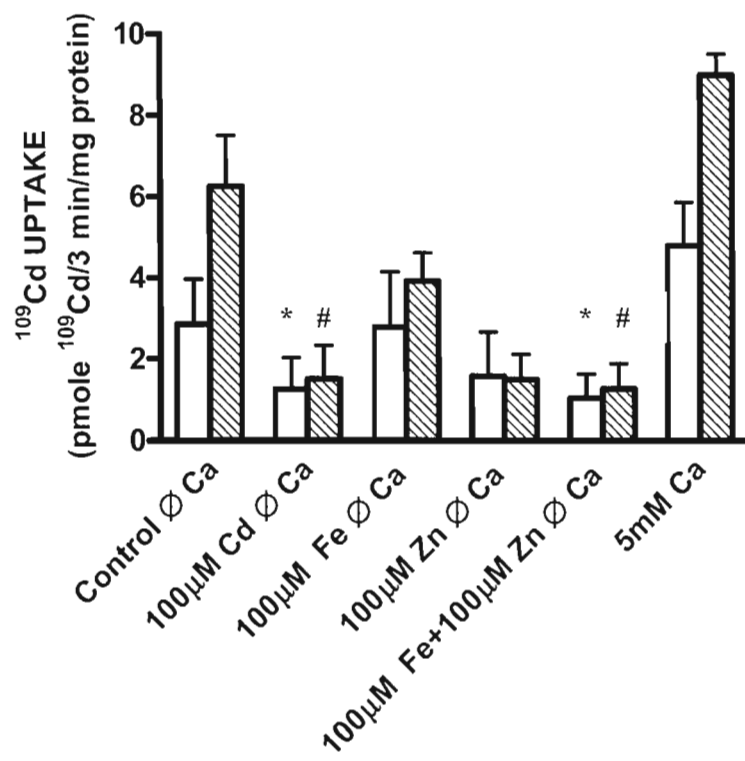




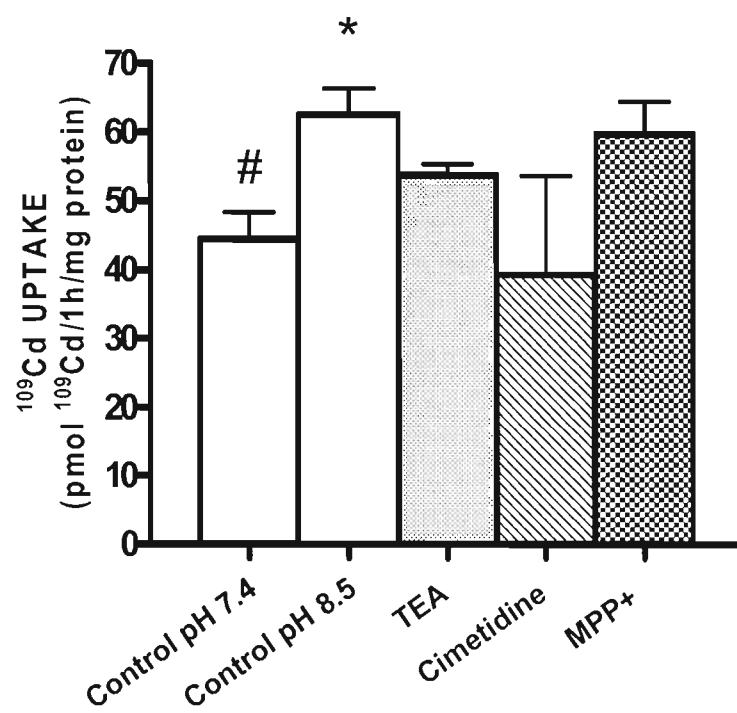




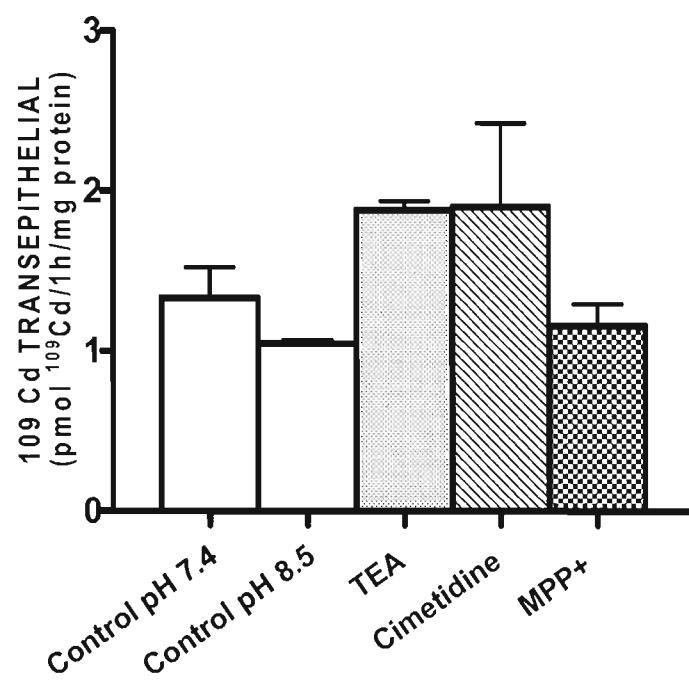


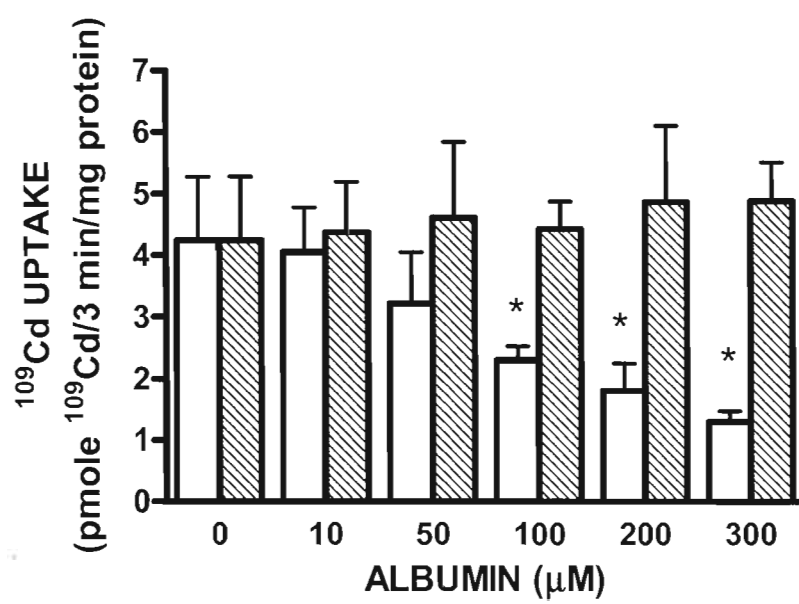


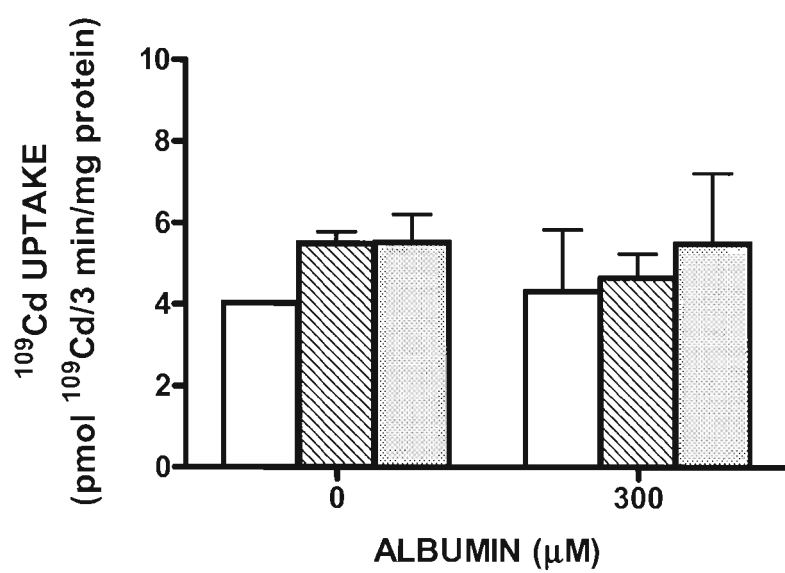
A

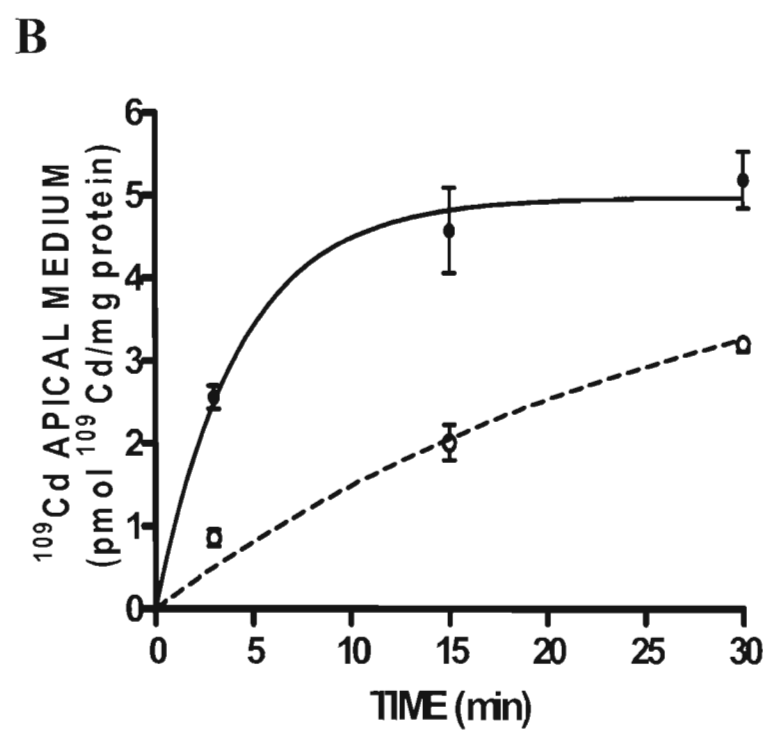
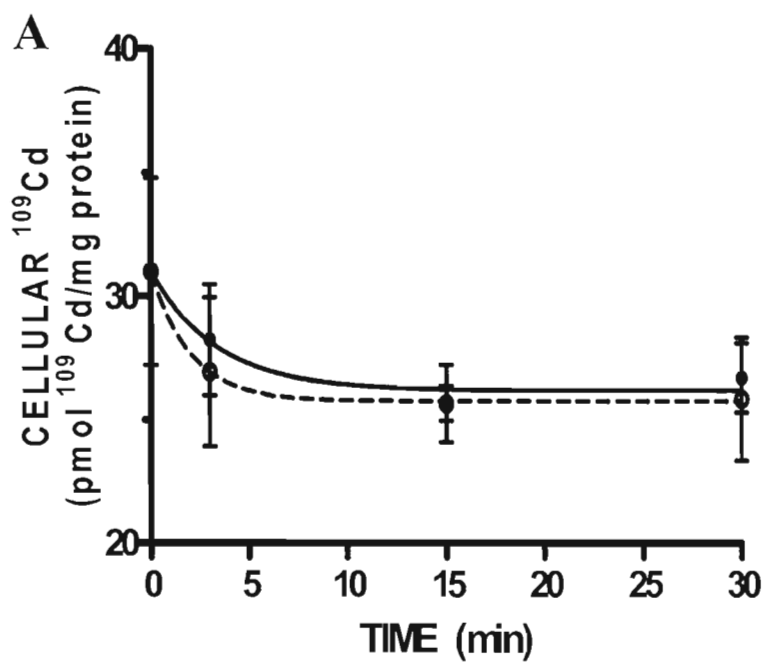


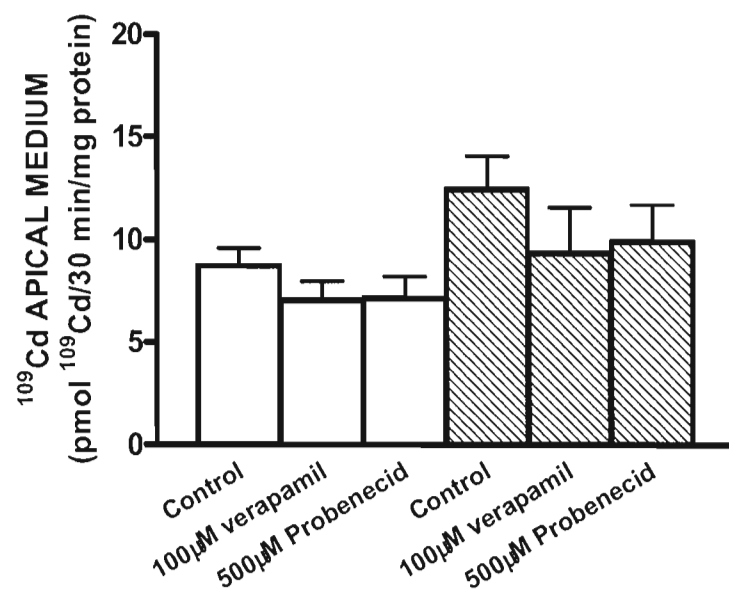
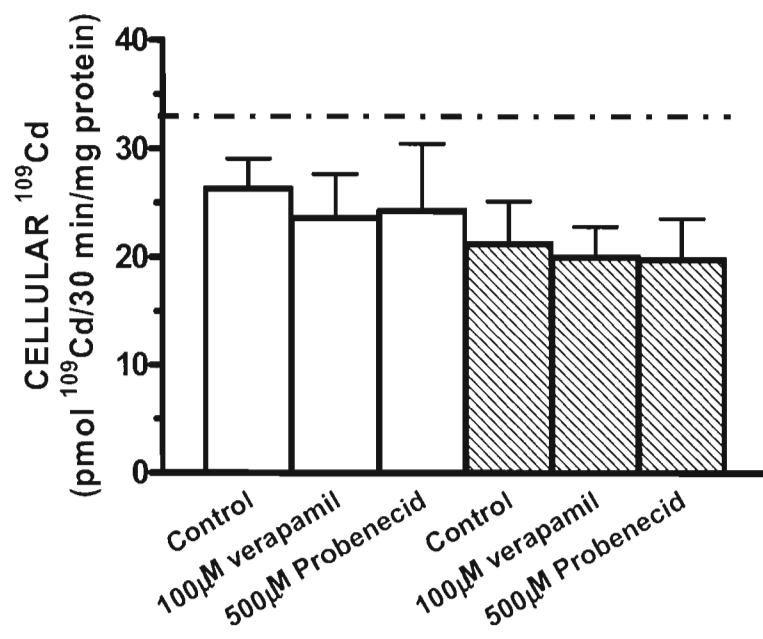
B











6.8 Tables

Table 6.1- Cd speciation in the chloride medium at pH 5.5, 7.4 and 8.5.

| CHLORIDE | | | | | |
|-------------------|---------|-------------------|---------|--------------------|---------|
| pH 5.5 | | pH 7.4 | | pH 8.5 | |
| Species | Total % | Species | Total % | Species | Total % |
| Cd^{2+} | 14.8 | Cd^{2+} | 14.7 | Cd^{2+} | 12.9 |
| CdCl^+ | 62.8 | CdCl^+ | 62.3 | CdCl^+ | 55.2 |
| CdCl_2 | 20.3 | CdCl_2 | 20.2 | CdCl_2 | 18 |
| CdCl_3^- | 1.7 | CdCl_3^- | 1.7 | CdCl_3^- | 1.5 |
| | | | | CdHCO_3^+ | 1.3 |
| | | | | CdCO_3 | 3.8 |
| | | | | CdHOCl | 6.6 |

Note: the composition of the transport media is described in the text. Cadmium speciation was calculated using the MINEQL⁺ chemical equilibrium program. Species listed are only those representing more than 1 % of the total dissolved metal.

Table 6.2- Cd speciation in the nitrate medium at pH 5.5, 7.4 and 8.5.

| NITRATE | | | | | |
|-------------------|---------|-------------------|---------|--------------------|---------|
| pH 5.5 | | pH 7.4 | | pH 8.5 | |
| Species | Total % | Species | Total % | Species | Total % |
| Cd^{2+} | 84.3 | Cd^{2+} | 83.5 | Cd^{2+} | 16.5 |
| CdNO_3^+ | 13.5 | CdNO_3^+ | 13.3 | CdHCO_3^+ | 1.6 |
| CdSO_4 | 1.8 | CdSO_4 | 1.8 | CdNO_3^+ | 4.9 |
| | | | | CdCO_3 | 2.7 |
| | | | | OCTAVITE | 73.3 |

Note: the composition of the transport media is described in the text. Cadmium speciation was calculated using the MINEQL⁺ chemical equilibrium program. Species listed are only those representing more than 1 % of the total dissolved metal.

Table 6.3 - Inhibition percentage of specific cellular accumulation of $0.5 \mu\text{M}$ ^{109}Cd in the presence of different metals (Cd, Fe, Zn and Fe + Zn) at pH 7.4 and pH 8.5 following a 3-min BL exposure in the absence of Ca.

| Metal | pH 7.4 | pH 8.5 |
|-------|--------|--------|
| Cd | 100 % | 100 % |
| Fe | 5 % | 49 % |
| Zn | 80 % | 100 % |
| Fe+Zn | 100 % | 100 % |

Table 6.4 – Cadmium speciation as a function of increasing concentrations of albumin (Source: Pham *et al.*, 2004)

| [BSA] (μM) | [^{109}Cd -2BSA] (nM) | [^{109}Cd -BSA] (nM) | Organic Cd % |
|----------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------|
| 1 | 0 | 2.6 | 1 |
| 10 | 0 | 24 | 8 |
| 50 | 0.19 | 91 | 30 |
| 100 | 0.22 | 140 | 47 |
| 200 | 0.21 | 190 | 63 |
| 300 | 0.18 | 220 | 73 |

Calculated ^{109}Cd speciation in the presence of BSA concentrations ranging from 1 to 300 μM . A fixed total ^{109}Cd level of $0.3 \mu\text{M}$ was used in all cases. Consequently, the percentage of BAS-bound Cd (Cd organic) has been calculated according to the stoichiometry of 1 Cd:1 BSA or 2 Cd:1 BSA. Albumin was added to the standard chloride transport medium, the composition of which is described in the text.

Table 6.5 –Parameters of ^{109}Cd cellular release in the presence or the absence of 100 μM unlabeled Cd in the efflux medium following pre-incubation at AP side.

| Cd release | | | |
|--------------|-------------------|--------------|-------------------|
| Std | | Unlabeled Cd | |
| $t_{1/2}$ | E_e | $t_{1/2}$ | E_e |
| (min) | (pmol/mg protein) | (min) | (pmol/mg protein) |
| ≈ 14 | 3.9 ± 1.3 | 3 ± 0.1 | 4.9 ± 0.3 |

Experimental conditions and analyses were described in the legend of figure 6.11 showing ^{109}Cd efflux from 21-days-old TC7 cells pre-exposed to 0.5 μM ^{109}Cd on the AP side for 2 h in the presence and the absence of 100 μM unlabeled Cd in the efflux media.

Table 6.6 – Efflux parameters describing the effect of verapamil and probenecid on the cellular ^{109}Cd release after 30 min of efflux following pre-incubation at the AP side.

| Efflux medium | | |
|---------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| Conditions | Cd released (pmol/mg protein) | Decrease (pmol/mg protein) |
| <i>Std</i> | | |
| Control | 8.7 ± 0.9 | |
| Verapamil | 7.0 ± 0.9 | 19 % |
| Probenecid | 7.1 ± 1.1 | 18 % |
| <i>Unlabeled Cd</i> | | |
| Control | 12.5 ± 1.6 | |
| Verapamil | 9.4 ± 2.2 | 25 % |
| Probenecid | 9.9 ± 1.8 | 20 % |

Experimental conditions and analyses were described in the legend to figure 6.12 showing ^{109}Cd efflux in the presence or the absence of MDR1 (verapamil) and MRP2 (probenecid) inhibitors from 21-days-old TC7 cells pre-exposed to 0.5 μM ^{109}Cd on the AP side for 2 h in the presence and the absence of 100 μM unlabeled Cd in the efflux media.

CHAPITRE VII

DISCUSSION

Ce projet de recherche est en continuité avec les travaux réalisés dans le laboratoire du Dr. Jumarie ayant démontré que le transport de Cd du côté BL était plus important que du côté AP dans les cellules TC7 (Jumarie *et al.*, 1999). Il est aussi important de rappeler qu'il s'agit ici d'une étude originale car à notre connaissance, aucun travaux publiés n'ont porté sur l'excrétion de Cd par l'épithélium intestinal.

7.1 Retour sur les objectifs de recherche

7.1.1 Objectif 1 : Caractériser le transport transépithélial du côté BL vers le côté AP dans les cellules TC7.

Plusieurs étapes ont été nécessaires pour caractériser le transport transépithélial de Cd du côté BL vers le côté AP dans les cellules TC7. D'abord il a fallu déterminer la partie non spécifique du transport de Cd à travers la membrane BL à l'aide de Cd non radioactif agissant comme pur compétiteur. Nous avons ensuite travaillé sur le transport du Cd en fonction du pH et de sa spéciation en milieu NO_3^- , complexant peu le Cd, ainsi qu'en milieu Cl^- , complexant le Cd à environ 80 %. Nous avons démontré que les CdCl_n^{2-n} sont mieux transportés à pH basique. Nous avons aussi démontré que même si en milieu NO_3^- , le Cd^{2+} est 6 fois plus présent qu'en milieu Cl^- , nous n'observons pas d'accumulation plus importante. Ceci peut être expliqué de deux façons: soit que l'accumulation de Cd observée n'est pas essentiellement due à l'accumulation de Cd^{2+} soit que l'absence d'augmentation d'accumulation proportionnelle à celle de la concentration Cd^{2+} dans le milieu témoigne d'une saturation des transporteurs impliqués. Bien que nous n'ayons pas observé de différence significative, on remarque une légère augmentation de l'accumulation non spécifique de Cd en fonction de l'augmentation du pH. Il est possible que le Cd ionisé soit

trop polaire pour pouvoir passer de façon rapide et efficace à travers la membrane cellulaire. L'augmentation que nous observons pourrait être due au changement dans la spéciation du Cd dans le milieu en fonction du pH. Plus le pH est basique, plus il y aurait présence d'espèces de Cd pouvant diffuser à travers la membrane dans le milieu d'exposition. En effet, en Cl^- et en NO_3^- , il y a une légère augmentation des espèces neutres entre le pH 5.5 et le pH 8.5 qui pourrait expliquer la légère augmentation de la diffusion passive de Cd en fonction du pH (Tableau 6.1 et 6.2). Toutefois, la présence d'espèces chimiques neutres entre pH 5.5 et pH 7.4 dans les deux milieux ne varie pas. En absence de Ca, l'accumulation du Cd diminuait. On peut donc supposer que l'accumulation cellulaire de Cd est aussi due à un co-transporteur transportant du Ca. Le Fe n'inhibait qu'en partie l'accumulation du Cd tandis que le Zn inhibait toute la portion spécifique ce qui suggère que le Cd aurait une plus grande affinité pour les transporteurs que le Fe. Cette diminution en présence de Zn rappelle certaines études ayant observé une diminution de l'absorption de Cd chez l'humain ou le rat en enrichissant les diètes en Zn (Flanagan *et al.*, 1978; Hoadley et Cousins, 1985; Waalkes et Rehm 1992).

Nous avons aussi caractérisé le transport de Cd lié à un ligand organique, le BSA. Nous avons observé que le Cd est aussi bien transporté en présence de BSA qu'en absence de BSA mais que l'accumulation du Cd observée en présence de BSA est possiblement due à une dissociation du complexe Cd-BSA avant l'entrée dans la cellule puisqu'aucun inhibiteur d'endocytose (dépendante ou non de clathrines) n'a eu d'effet.

7.1.2 Objectif 2 : Évaluer quels transporteurs sont impliqués dans le transport du Cd et dans quelle proportion ils y jouent un rôle.

Lors de notre étude, nous avons obtenu certains résultats indiquant l'implication d'OCT1 dans l'accumulation cellulaire de Cd à la membrane BL. En effet, nous avons démontré que les CdCl_n^{2-n} sont mieux transportés à pH basique (augmentation de l'accumulation de 26 % entre pH 7.4 et pH 8.5 sur 3 min), ce qui nous donne un indice de l'implication d'OCT1 dans l'accumulation de Cd car OCT1 est connu pour être stimulé à pH basique (Koepsell *et al.*, 2003). Les résultats obtenus avec des inhibiteurs d'OCT1 sont aussi venus renforcer son implication possible dans le transport BL de Cd. En effet, une inhibition

a été observée par le TEA ainsi que par la cimetidine, l'inhibition de cette dernière étant plus importante.

Nos travaux ont démontré que la partie du Cd accumulé qui n'est pas irréversiblement liée dans l'entérocyte peut être excrétée du côté AP. Grâce à l'utilisation de la vérapamil et du probenecid, nous avons aussi suggéré que les transporteurs MDR1 et MRP2 sont impliqués dans l'excrétion du Cd du côté AP. Nos résultats suggèrent aussi l'implication d'un autre type de transporteur stimulé en présence de Cd non radioactif dans le milieu d'efflux. La stimulation en présence de Cd dans le milieu d'efflux nous indique qu'il s'agit d'un mécanisme de contre-échange pouvant transporter le Cd dans les deux directions simultanément. Il est impossible que ce mécanisme de contre-échange fasse partie de la famille des transporteurs ABC comme MDR1 et MRP2 car cette famille ne compte que des systèmes d'export dans la cellule eucaryote (Mourez *et al.*, 2000). Après avoir cherché dans la littérature, nous supposons qu'il pourrait s'agir d'un autre membre de la famille des transporteurs SLC22A; OCTN1 qui est exprimé dans la lignée cellulaire Caco-2 (Watanabe *et al.*, 2002). Comme plusieurs membres de cette famille, il possède une grande variété de substrats (Koepsell et Hendou, 2004). Par contre, contrairement à OCT1 qui fait aussi partie de la famille des transporteurs SLC22A, OCTN1 peut agir comme transporteur antiport et il se retrouve uniquement du côté AP des cellules polarisée. De plus, des études de Yabuchi *et al.* (1999) ont démontré que l'efflux de TEA par OCTN1 était plus important en présence de TEA dans le milieu d'efflux ce qui est comparable à nos observations sur l'efflux de Cd.

7.2 Retour sur l'approche scientifique

7.2.1 La technique utilisée

Aucune mise au point n'a été nécessaire au niveau de la technique utilisée lors des expériences de transport membranaire de Cd. En effet, chacune de nos manipulations ont généré des résultats comparables entre eux.

Lors des manipulations, une seule condition aurait pu être améliorée afin de se rapprocher des conditions *in vivo* : la température. En effet, toutes nos expériences ont été

réalisées à température ambiante qui variait entre 21 et 23 °C. Pour se rapprocher des conditions *in vivo*, il aurait été pertinent de travailler à une température constante de 37.5 °C. Dans nos installations, le travail sur filtres ne nous permet malheureusement pas de nous assurer que la température du milieu d'exposition des cellules au traceur radioactif est toujours stable pendant la période d'accumulation. En effet, il aurait fallu faire les manipulations à l'aide d'une table thermostatée à laquelle nous n'avons pas accès. Il aurait été possible de travailler sur une plaque reposant sur un bain-marie mais cette technique ne nous aurait pas permis de contrôler la température du milieu AP. Il aurait donc été faux d'affirmer que la température était constante à 37.5 °C durant toute la période d'accumulation. Finalement, ayant aussi travaillé sur des temps très courts (3 min), l'utilisation de l'incubateur à cultures n'était pas souhaitable, la température variant très rapidement après plusieurs ouvertures et fermetures successives de la porte. Il était donc préférable de travailler à une température ambiante qui est très peu susceptible de varier au cours de la période d'accumulation. En travaillant dans ces conditions, il est vrai que la vitesse du transport n'est pas optimale comparativement à 37.5 °C (dépendamment de l'activité "catalytique" la vitesse initiale peut doubler pour chaque tranche d'augmentation de 5 °C), mais les caractéristiques d'un système de transport ne changent pas avec la température. En fait, travailler à plus basse température nous a peut-être permis de réduire suffisamment la vitesse de certains processus de transport qui auraient pu être trop rapides pour être observés en utilisant une table thermostatée .

7.2.2 Modèle cellulaire

Au cours de nos recherches, nous avons travaillé avec la lignée cellulaire Caco-2 et un clone de cette lignée, les cellules TC7 (Chantret *et al.*, 1994). Au tout début de ce projet, certaines expériences de caractérisation de transport ont été réalisées sur les cellules Caco-2. Les cellules présentaient les caractéristiques de transport de Cd attendues et déjà observées dans notre laboratoire. Nous avons par la suite eu accès aux cellules TC7, clone hautement différencié des cellules Caco-2. Suite à des expériences contrôlées réalisées pour s'assurer que les cellules TC7 présentaient les mêmes caractéristiques de transport que les cellules Caco-2, nous avons pris la décision de ne travailler que sur les cellules TC7. En effet, les cellules TC7 nous permettaient de travailler sur des cellules plus différenciées que les cellules Caco-2,

donc peut-être plus représentatives de l'entérocyte normal aussi en termes de systèmes de transport (la différenciation des cellules TC7 ayant surtout été définie en regard de l'expression des dissaccharidases et des peptidase). L'utilisation des cellules TC7 augmentait donc aussi nos chances d'observer certaines subtilités au niveau des caractéristiques de transport.

Dans les deux cas, il ne faut pas oublier que nos résultats proviennent d'une lignée cellulaire transformée ayant des caractéristiques de cellules cancéreuses. C'est en particulier vrai pour l'expression de certains transporteurs qui sont exprimés de façon plus importante dans les cellules cancéreuses. C'est le cas du transporteur MDRI (Hooijberg *et al.*, 1999; Tada *et al.*, 2000) et du transporteur MRP2 (Mechetner *et al.*, 1998; Young *et al.*, 2001) qui sont responsables de la résistance aux traitements de chimiothérapie grâce à leur rôle dans les processus d'efflux et à leur surexpression dans les cellules cancéreuses. Il faut donc tenir compte du fait que les résultats obtenus sur une lignée cellulaire peuvent être différents des résultats que nous obtiendrions en travaillant sur des cultures primaires.

7.3 Projet d'étude par rapport à la problématique initiale

Des études ont démontré que la plupart des aliments consommés au Canada contiennent du Cd (MacLatchy, 1992). L'ingestion d'aliments contaminés est donc la première cause d'exposition au Cd pour la population générale, sauf pour les fumeurs et certains travailleurs en industries. En effet, l'intestin grêle est responsable de l'absorption de nutriments mais est aussi susceptible d'absorber des substances toxiques présentes dans la nourriture comme le Cd. Suite à une absorption de Cd, une partie de ce dernier s'accumule dans les organes cibles tandis qu'une partie reste liée à des protéines en circulation dans le sang. Le côté sanguin de l'épithélium intestinal est donc exposé au Cd. Des travaux antérieurs réalisés dans notre laboratoire ont démontré que la voie empruntée par le Cd était surtout la voie transcellulaire via des transporteurs membranaires mais aussi que l'accumulation de Cd était plus importante du côté BL que du côté AP (Jumarie *et al.* 1997; 1999). C'est pourquoi, nous nous sommes penchés sur la problématique d'excrétion du Cd via l'épithélium intestinal en ciblant certains transporteurs.

Nous avons observé que le Cd peut être pris en charge du côté sanguin (BL) des cellules pour être excrété par la suite du côté de la lumière intestinale (AP). Par contre, l'excrétion du Cd accumulé dans l'enterocyte est limitée. Notre étude, de même que d'autres travaux publiés de notre laboratoire, ont démontré qu'il existe une barrière intracellulaire limitant l'efflux de Cd du côté AP (Jumarie *et al.* 1999). En effet, lors de l'efflux de Cd, une très faible partie du Cd intracellulaire est réversiblement liée et rapidement excrétée tandis qu'une partie plus importante du Cd est irréversiblement liée et reste emprisonnée dans la cellule. Nos travaux ont donc démontré *in vitro* que l'excrétion de Cd par l'épithélium intestinal est possible de deux façons une fois le Cd dans l'entérocyte; 1) en excrétant une partie du Cd du côté AP de la cellule; 2) en emprisonnant le Cd dans l'entérocyte jusqu'à sa mort par apoptose et son détachement de la muqueuse, l'épithélium intestinal se renouvelant très rapidement (4-6 jours). De ces deux façons, le Cd se retrouvera dans la lumière intestinale et sera excrété de l'organisme par les selles.

Il est certain que les conclusions tirées ici sont basées sur des résultats obtenus en laboratoire sur une lignée cellulaire dans des conditions où chaque paramètre est contrôlé. Il serait malaisé d'extrapoler ces conclusions *in vivo* où les conditions sont toutes autres. Par contre, les résultats *in vitro* obtenus ici ont permis d'éclaircir un peu plus les caractéristiques du transport du Cd dans les entérocytes. Dans le futur, cela permettra à des chercheurs de se concentrer sur d'autres paramètres du transport de Cd pour éventuellement proposer des solutions au problème de toxicité du Cd.

7.4 Perspectives futures

Il est certain que les résultats engendrés par un tel projet conduiront à de plus amples questionnements ainsi qu'à plusieurs nouvelles hypothèses. Par exemple, il serait intéressant de tenter de mieux cibler l'implication d'autres transporteurs pouvant être susceptibles de transporter le Cd à travers l'épithélium intestinal. Comme nous l'avons vu au chapitre dernier, l'efflux AP de Cd n'est pas uniquement dû aux transporteurs MDR1 ou MRP2, qui sont strictement des mécanismes d'efflux, mais aussi à un ou plusieurs transporteurs fonctionnant en contre-échange.

La suite de ce projet pourrait aussi tenter de mieux cibler le transport transépithélial de Cd uniquement dans des conditions organiques qui se rapprochent beaucoup plus des conditions *in vivo* que les conditions inorganiques dans lesquelles nous avons travaillé la plupart du temps. Dans le cadre de ce projet, nous avons fait très peu de manipulations en conditions organiques avec l'albumine pour deux raisons : 1) l'albumine est une si grosse protéine de transport qu'elle est peu susceptible d'être transportée par un transporteur; 2) le transport du Cd lié à l'albumine qui est observé est peut-être dû uniquement au Cd qui s'est dissocié de l'albumine avant de traverser la membrane. Dans le futur, refaire les expériences en conditions organiques impliquera donc l'utilisation d'un double marquage permettant de mesurer parallèlement le Cd et le ligand en rapport avec la stoichiométrie de complexation connue. En effet, le Cd devra être marqué ainsi que son ligand organique. On pourra alors avoir la certitude que le Cd aura bien pénétré la cellule lié à un ligand organique et non en s'en dissociant avant de traverser la membrane.

De plus, certaines expériences pourraient être réalisées en privant les cellules de GSH, ce qui nous donnerait un autre indice de la proportion de l'implication de MRP2 dans l'efflux AP de Cd puisque MRP2 est connu pour expulser des conjugués au GSH. On pourrait aussi tenter des expériences de transport membranaire au côté BL en diminuant l'ATP intracellulaire. Nous pourrions ainsi déterminer si les transporteurs responsables du transport BL de Cd sont uniquement des transporteurs de diffusion facilitée ou des systèmes actifs (primaires ou secondaires, dépendants directement ou indirectement de l'ATP).

Nous avons fait quelques analyses RT-PCR qui n'ont pas donné de résultats concluant mais ces études devraient être poursuivies afin de caractériser la présence d'ARNm pour OCT1, MDR1 et MRP2. Dans le cadre de ce projet, nous avons fait deux tentatives qui se sont malheureusement avérées infructueuses pour OCT1, les niveaux d'expression d'ARNm de ce dernier étant extrêmement faibles dans Caco-2 (Seithel *et al.*, 2006). La présence d'ARNm n'étant pas une preuve de l'expression fonctionnelle de ces transporteurs, un *western blot* pourrait être effectué afin de détecter leur expression au niveau protéique dans les cellules Caco-2 de jour 21, une fois l'ARNm détecté par RT-PCR. Des résultats concluants de RT-PCR et de *western blot* confirmeraient l'expression de ces transporteurs mais pour aller plus loin, il serait intéressant de pouvoir confirmer le rôle de ces transporteurs

dans le transport de Cd. La technique de l'ARN interférant pourrait être utilisée afin de diminuer fortement l'expression de ces systèmes de transport et ainsi vérifier si les caractéristiques fonctionnelles du transport membranaire de Cd sont ou non conservées suite à une diminution d'expression d'OCT1, de MDR1 et de MRP2.

Certains résultats ont permis de déterminer que s'il existe une différence entre l'accumulation AP et BL de Cd au jour 21, cela n'est pas le cas aux jours de cultures 10 et 31. En effet, au jour 10 l'accumulation BL n'est pas significativement supérieure comparativement à l'accumulation AP. Au jour 21, la différence devient très marquée mais elle n'est plus observée au jour 31. Ainsi, du jour 10 au jour 21, l'accumulation BL augmente considérablement puis chute au niveau de l'accumulation AP au jour 31. De plus, la variation de l'accumulation BL en fonction du temps de culture est plus marquée que la variation de l'accumulation AP. Cette distinction suggère une différence dans l'expression des transporteurs impliqués dans l'accumulation cellulaire de Cd en fonction du temps de culture, et ce, de façon préférentielle puisque l'accumulation AP et BL diminuent toutes deux mais pas de façon parallèle. Des recherches sont présentement en cours afin de tenter d'identifier quels sont les transporteurs AP et BL dont l'expression varie en fonction du temps de culture.

CONCLUSION

Le Cd est un métal lourd ayant des effets toxiques à de très faibles concentrations. La population générale y est exposée via l'absorption intestinale suite à l'ingestion d'aliments contaminés. Sa demi-vie dans le corps humain étant très longue, le risque d'intoxication chronique est donc important. Plusieurs études ont abordé la question de l'excrétion de Cd par les reins ou le foie mais aucune étude n'a considéré l'épithélium intestinal comme organe excréteur pour le Cd. Notre projet s'inscrit donc dans une démarche de compréhension et d'identification des mécanismes empruntés par l'épithélium intestinal pour excréter le Cd. Suite à notre étude, nous pouvons maintenant affirmer que l'épithélium intestinal peut aussi être considéré comme organe d'excrétion du Cd. Nous avons démontré qu'il est justifié de considérer que, lors d'intoxication chronique, le Cd présent dans le sang puisse être transporté du côté sanguin (BL) de la membrane cellulaire. Ce transport serait en partie réalisé par un transporteur de la famille des *Solute Carriers*, OCT1. Une fois dans la cellule, le Cd peut être excrété en partie activement par des transporteurs de la famille des transporteurs ABC, MDR1 et MRP2. Le reste du Cd accumulé au BL reste lié dans la cellule qui entrera en apoptose lors du processus de renouvellement cellulaire de l'épithélium intestinal.

L'exploration des différentes voies empruntées par le Cd lors de l'excrétion intestinale représente un champ de recherche futur de première importance afin d'avoir une meilleure compréhension de la toxicocinétique du Cd et une meilleure évaluation du risque.

RÉFÉRENCES

Adamsson E., Piscator M., Nogawa K.. 1979. Pulmonary and gastrointestinal exposure to cadmium oxide dust in a battery factory. *Environ Health Perspect* 28:219-222.

Aleksunes, L.M., Cui, Y., Klaassen, C.D., 2008, Prominent Expression of Xenobiotic Efflux Transporters in Mouse Extraembryonic Fetal Membranes Compared with Placenta, *Drug Metabolism and Disposition Fast Forward*, DMD 36:1960-1970, 2008

Anderle, P., Niederer, E., Rubas, W., Hilgendorf, C., Spahn-Langguth, H., Wunderli-Allenspach, H., Merkle, H.P., Langguth, P. 1997. P-Glycoprotein (P-gp) Mediated Efflux in Caco-2 Cell Monolayers: The Influence of Culturing Conditions and Drug Exposure on P-gp Expression Levels, *Journal of Pharmaceutical Sciences* Volume 87, Issue 6, p. 757-762.

Andersen, O., Nielsen, J.B., Svendsen, P. 1988. Oral cadmium chloride intoxication in mice: effects of dose on tissues damage, intestinal absorption and relative organ distribution. *Toxicology* 48:225-236.

ATSDR. 1993. Toxicological Profile for Cadmium, United States Public Health Service, 171 pp.

ATSDR, (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), 1999 Toxicological profile for cadmium, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Services, 397 p.

Ballatori, N., 2002, Transport of Toxic Metals by Molecular Mimicry, Department of Environmental Medicine, University of Rochester School of Medicine, Rochester, New York, USA

Bannon D.I., Abounader R., Lees P.S., Bressler J.P. 2003. Effect of DMT1 knockdown on iron, cadmium, and lead uptake in Caco-2 cells, *Am J Physiol Cell Physiol.*, 284(1):C44-50.

Beijer, K., Jernelov, A. 1986. Sources transport and transformation of metals in the environment, In Friberg, L., Norberg GF, Vouk VB (eds): *Handbook on the Toxicology of Metals*. 2nd ed, General Aspects, Amsterdam: Elsevier, pp 68-74.

Bergkvist, B. 1986. Leaching of Metals from a Spruce Forest Soil as Influenced by Experimental Acidification. *Water Air Soil Pollut.*, 31: 901-916.

Bergkvist, B., Folkesson, L., Berggren, D.1989. Fluxes of Cu, Zn, Pb, Cd, Cr, and Ni in Temperate Forest Ecosystems. *Water. Air Soil Pollut.*, 47: 217-286.

Bernard A., Roels H., Buchet J.P., Cardenas A, Lauwerys R. 1992. Cadmium and health: the

Belgian experience. IARC Scientific Publications ; 118: 15–33

Besterman, J. M., Low, R. B. 1983. Endocytosis: a review of mechanisms and plasma membrane dynamics. *Biochem. J.*, 210, 1-13

Beton, D.C., Andrews, G.S., Davies, H.J. 1966. Acute cadmium fume poisoning; five cases with one death from renal necrosis. *Br J Ind Med* 23

Bewers, J.M., Barry , P.J., MacGregor. D.J. 1987. Distribution and Cycling of Cadmium in the Environment, *Cadmium in the Aquatic Environment*, J.O. Nriagu et J.B. Sprague (éd.), John Wiley and Sons, Toronto (Ont.), pp. 1-18 .

Blais, A., Bissonnette, P., Berteloot, A. 1987. Common characteristics for Na⁺-dependent sugar transport in Caco-2 cells and human fetal colon, *Journal of membrane biology* 99: 113-125.

Blazka, M.E. et Shaikh, Z.A. 1991. Differences in cadmium and mercury uptakes by hepatocytes: Role of calcium channels, *Toxicology and Applied Pharmacology* Volume 110, Issue 2, p. 355-363

Bleasby, K., Chauhan S., Brown, C.D.A.. 2000. Characterization of MPP⁺ secretion across human intestinal Caco-2 cell monolayers: role of P-glycoprotein and a novel Na⁺-dependent organic cation transport mechanism *British Journal of Pharmacology* 129, 619–625.

Blume, H.-P., Brummer., G. 1991. «Prediction of Heavy Metal Behavior in Soil by Means of Simple Field Tests», *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 22: 164-174.

Borst, P., Evers, R., Kool, M., Wijnholds, J. 1999. The multidrug resistance protein family, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1461: 347-357.

Broeks, A., Gerrard, B., Allikmets, R., Dean, M., Plasterk, R.H.A. 1996. Homologues of the human multidrug resistance genes MRP and MDR contribute to heavy metal resistance in the soil nematode *Caenorhabditis elegans*, *The EMBO Journal* vol.15 no.22 pp.6132-6143

Buchet JP, Lauwerys R, Roels H,. 1990. Renal effects of cadmium body burden of the general population. *Lancet* 336:699-702.

Budavari, S., O'Neil, M.J. Smith, A. Heckelman, P.E. 1989. *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*, Merck and Company Inc., Rahway, NJ

Busch, A. E., Karch, U., Miska, D., Gorboulev, V., Akhoundova, A., Volk, C., Arndt, P., Ulzheimer, J.C., Sonders, M.S., Baumann, C., Waldegger, S., Lang, F., and Koepsell, H., 1998, Human Neurons Express the Polyspecific Cation Transporter hOCT2, Which Translocates Monoamine Neurotransmitters, Amantadine, and Memantine, *Molecular pharmacology*, Vol. 54, Issue 2, 342-352.

Casarett, L.J., Klaassen, C.D., Watkins, J.B. 2003. Casarett and Doull's essentials of toxicology / Curtis D. Klaassen et John B. Watkins III Éditeurs.: McGraw-Hill/Medical Pub. Div., New York, 533 pages.

CCMRE, (Conseil canadien des ministres des ressources et de l'environnement), 1987. Recommandations pour la qualité des eaux au Canada, document préparé par le Groupe de travail sur les recommandations pour la qualité des eaux.

Chanmugathas, P., Bollag, J.M. 1987. Microbial Mobilization of Cadmium in Soil Under Aerobic and Anaerobic Conditions, *J. Environ. Qual.*, 16: 161-167.

Chantret I., Rodolosse A., Barbat A., Dussaulx E., Brot-Laroche E., Zweibaum A., Rousset M. 1994. Differential expression of sucrase-isomaltase in clones isolated from early and late passages of the cell line Caco-2: evidence for glucose-dependent negative regulation, *J Cell Sci.*; 107 : 213-25.

Christensen, T.H. 1984. Cadmium Soil Sorption at Low Concentrations: II. Reversibility, Effect of Changes in Solute Composition, and Effect of Soil Ageing, *Water Air Soil Pollut.*, 21: 115-125.

Christensen, T.H. 1989. Cadmium Soil Sorption at Low Concentrations: VIII. Correlation with Soil Parameters, *Water Air Soil Pollut.*, 44: 71-82.

Dalton, T. P., He, L., Wang, B., Miller, M. L., Jin, L., Stringer, K. F., Chang, X., Baxter, C. S., Nebert, D. W., 2004, Identification of mouse SLC39A8 as the transporter responsible for cadmium-induced toxicity in the testis, *PNAS*.

Dijkstra, M., Havinga, R., Vonk, R.J., Kuipers, F. 1996. Bile secretion of cadmium. Silver, zinc and copper in the rat. Involvement of various transport systems, *Life Sciences*, Vol. 59, No. 1237-1246.

Duizer, E., Gilde, A. J., Versantvoort C. H. M., Groten, J. P. 1999. Effects of Cadmium Chloride on the Paracellular Barrier Function of Intestinal Epithelial Cell Lines, *Toxicology and Applied Pharmacology* Volume 155, Issue 2, p. 117-126

Elinder, C.-G. 1992. Cadmium as an environmental hazard. In: Normand, G.F., Heber, R.F.M., Alessio, L. (Eds.), *Cadmium in the Human Environment: Toxicity and Carcinogenicity*. International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp. 123-131.

Elisma, F., Jumarie, C. 2001, Evidence for Cadmium Uptake through Nramp2: Metal Speciation Studies with Caco-2 Cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 285, 662-668.

Énergie, Mines et Ressources Canada, 1991. Mines et usines de traitement des minéraux au Canada, rapport MR 227, Ottawa, Ontario.

Environnement Canada. 1991. Measurement Program for Toxic Contaminants in Canadian Urban Air: Update and Summary Report», Report No. PMD 91-2 (rapport inédit), Division de la mesure de la pollution, Centre de technologie environnementale de River Road, Conservation et Protection, Ottawa.

Eriksson, J.E. 1989. The Influence of pH, Soil Type and Time on Adsorption and Uptake by Plants of Cadmium Added to the Soil, *Water Air Soil Pollut.*, 48: 317-336.

Flanagan P.R., McLellan J., Haist J. 1978. Increased dietary cadmium absorption in mice and human subjects with iron deficiency. *Gastroenterology* 74:841-846.

Fogh J, Fogh JM, Orfeo T. 1977. One hundred and twenty-seventy cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *Journal of National Cancer Institute* 59:221-5.

Fones, G.R., Nimmo, M. 1993. «Atmospheric Trace Metal Inputs to the Irish Sea», *Proceedings from the International Conference on Heavy Metals in the Environment*, vol. 1, pp. 97- 100 (1993).

Fortin, C., Campbell, P. G. C. 2000. Silver uptake by the green alga *Chlamydomonas Reinhardtii* in relation to chemical speciation: Influence for chloride. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 2769–2778.

Foulkes, E. C., Blanck, S. 1990. Acute cadmium uptake by rabbit kidneys: Mechanism and effects. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 102, 464–473.

Friberg L. 1950. Health hazards in the manufacture of alkaline accumulators with special reference to chronic cadmium poisoning. *Acta Med Scand; Suppl* 240: 1–124

Friberg L, Elinder CG, Kjellstrom T, Nordberg GF. 1985. Cadmium and health. A toxicological and epidemiological appraisal. Vol. 1. Boca Raton, FL: CRC Press.

Gekle, M., Mildenerberger, S., Freudinger, R., Schwerdt, G., Silbernagl, S. 1997. Albumin endocytosis in OK cells: dependence on actin and microtubules and regulation by protein kinases, *Am J Physiol Renal Physiol* 272: F668-F677,

Gerk, P.M., Vore, M., 2002, Regulation of expression of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) and its role in drug disposition. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302, pp. 407–415.

Gorboulev, V, Ulzheimer JC, Akhoundova A, Ulzheimer-Teuber I, Karbach U, Quester S, Baumann C, Lang F, Busch AE, and Koepsell H. 1997. Cloning and characterization of two human polyspecific organic cation transporters. *DNA and Cell Biology* 16:871-881.

Goumakos W, Laussac JP, Sarkar B. 1991. Binding of cadmium (II) and zinc (II) to human and dog serum albumins. An equilibrium dialysis and ¹¹³Cd-NMR study. *Biochemistry and Cell Biology* 69:809-20.

Gouvernement du Canada/Environnement Canada/Santé Canada, 1994. Loi canadienne sur la protection de l'environnement, Rapport d'évaluation, Liste des substances d'intérêt prioritaire, Le cadmium et ses composés, 114p.

Gründemann, D, Gorboulev V, Gambaryan S, Veyhl M, and Koepsell H. 1994. Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter. *Nature* 372:549-552.

Gunn S.A, Gould T.C, Anderson W.A.D. 1968. Mechanisms of zinc, cysteine and selenium protection against cadmium-induced vascular injury to mouse testis. *J Reprod Fertil* 15:65-70.

Hauri H.P, Sterchi E.E, Bienz D, Fransen M.A, Marxer A. 1985. Expression of intracellular transport of microvillus membrane hydrolases in human intestinal epithelial cells. *J Cell Biol.* 101:838-51.

Hays E.S., Margaretten N. 1985. Long-term oral cadmium produces bone marrow hypoplasia in mice. *Exp Hematol* 13:229-234.

Higgins, C.F., Callaghan, R., Linton, K.J., Rosenberg, M.F., Ford, R.C. 1997. Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein seminars in cancer biology Vol 8, pp 135-142.

Hirohashi, T., Suzuki, H., Chu, X-Y., Tamai, I., Tsuji A., Sugiyama, Y. 2000. Function and Expression of Multidrug Resistance-Associated Protein Family in Human Colon Adenocarcinoma Cells (Caco-2), *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 292: 265-270.

Hooijberg, J. H., Broxterman, H. J., Kool, M., Assaraf, Y. G., Peters, G. J., Noordhuis, P., Scheper, R. J., Borst, P., Pinedo, H. M., Jansen, G., 1999, Antifolate resistance mediated by multi drug resistance protein MRP1 and MRP2, *Cancer Res.*, 59, 2532-2535.

Hoffmann, U., Kroemer, H. K. 2004. The ABC Transporters MDR1 and MRP2: Multiple Functions in Disposition of Xenobiotics and Drug Resistance, *Drug Metabolism Reviews*, Volume 36, Issue 3 & 4 pages 669 - 701

Hoadley, J.E., Cousins, R.J. 1985. Effects of dietary zinc depletion and food restriction on intestinal transport of cadmium in the rat. *Proc Sot Exp Biol Med* 180:296-302.

Hoskin, W.M.A. 1991. Cadmium, *Annuaire des minéraux du Canada 1990*, Énergie, Mines et Ressources Canada, Ottawa (Ont.), pp. 17.1-17.7.

Hotz P, Buchet JP, Bernard A, Lison D, Lauwerys R. 1999. Renal effects of low-level environmental cadmium exposure: 5-year follow-up of a subcohort from the Cadmibel study. *Lancet*; 354: 1508-13

Howell S, Kenny A J, Turner A.J. 1992. A survey of membrane peptidases in two human colonic cell lines, Caco-2 and HT-29. *Biochem J*; 284:595-601.

Huet C, Sahuquillo-Merino C, Coudrier E, Louvard D. 1987. Absorptive and mucus-secreting subclones isolated from a multipotent intestinal cell line (HT-29) provide new models for cell polarity and terminal differentiation. *J Cell Biol*; 105:345-57.

INERIS, 2005, Le cadmium et ses dérivés, Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques, Version No 2.

Inskip H, Beral V. 1982. Mortality of Shiphams residents: 40-year follow-up. *Lancet*: 896-899.

Inui, K.I., Yamamoto, Y, Saito, H. 1992. Transepithelial transport of oral cephalosporins by monolayers of intestinal epithelial cell line Caco-2: specific transport systems in apical and basolateral membrane. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 261: 195-201.

Itokawa Y, Abe T, Tabei R. 1974. Renal and skeletal lesions in experimental cadmium poisoning. *Arch Environ Health* 28:149-154.

Järup L, 2002, Cadmium overload and toxicity, *Nephro Dial Transplant*, 17:35-39.

Järup L, Persson B, Elinder C-G. 1995. Decreased glomerular filtration rate in cadmium exposed solderers. *Occup Environ Med*; 52: 818-22

Jaeger, D.E., 1990. Absorption interactions of zinc and cadmium in the isolated perfused rat intestine. *J Trace Elements Electrolytes Health Disease* 4:101-105

Jonker, J.W., Schinkel, A.H. 2003. Pharmacological and physiological functions of the Polyspecific Organic Cation Transporters: OCT1, 2 and 3 (SLC22A1-3). *Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics Fast Forward*, DOI:10.1124/jpet.103.053298.

Jonker, J.W., Wagenaar, E., Mol, C.A., Buitelar, M., Koepsell, H., Smit, J.W., Shinkel, A.H. 2001. Reduced hepatic uptake and intestinal excretion of organic cations in mice with targeted disruption of the organic cation transporter 1 (OCT1[SLC22A1]), *Molecular and Cellular Biology* 21: 5471-5477.

Jumarie, C., Campbell, P.G.C., Berteloot, A., Houde, M., Denizau, F. 1997. Caco-2 cell line used as an in vitro model to study cadmium accumulation in intestinal epithelial cells. *J Membr Biol* 158:31-48.

Jumarie, C., Campbell, P.G.C., Houde, M., Denizau, F. 1999. Evidence for an Intracellular Barrier to Cadmium Transport through Caco-2 Cell Monolayers, *J. Cell. Physiol.* 180:285-297.

Jumarie, C., Malo, C. 1991. Caco-2 cells cultured in serum-free medium as a model for the study of enterocytic differentiation in vitro, *Journal of cellular*, vol. 149, n°1, pp. 24-33

- Karam, S.M. 1999. Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut. *Frontier in Biosciences*, Vol 4, D286 - D298.
- Karbach, U., Kricke, J.O., Meyer-Wentrup F., Gorboulev, V., Volk, C., Löffing-Cueni, D., Kaissling, B., Bachmann, S., Koepsel, H. 2000. Localization of organic cation transporters OCT1 and OCT2 in rat kidney, *Am J Physiol Renal Physiol* 279: F679–F687.
- Kazantzis G, Lam TH, Sullivan KR. 1988. Mortality of cadmium-exposed workers. A five-year update. *Stand J Work Environ Health* 14:220-223.
- Keating, J. 1993. Preliminary Estimates of Cadmium Production, Imports and Exports (données inédites), Secteur des mines, Ressources naturelles Canada, Ottawa, Ontario.
- Kekuda, R., Prasad P.D., Wu X., Wang H., Fei Y.J., Leibach F.H., Ganapathy V. 1998. Cloning and functional characterization of a potential-sensitive, polyspecific organic cation transporter (OCT3) most abundantly expressed in placenta. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 15971-15979.
- Kelman B.J., Walter B.K., Jarboe G.E. 1978. Effect of dietary cadmium on calcium metabolism in the rat during late gestation. *Proc Soc Exp Biol Med* 158:614-617.
- Kipling M.D., Waterhouse J.A.H. 1967. Cadmium and prostatic carcinoma. *Lancet* 1:730.
- Kimura M., Otaki N., Yoshiki S., 1974. The isolation of metallothionein and its protective role in cadmium poisoning. *Arch Biochem Biophys* 165:340-348.
- Kjellstrom T, Friberg L, Rahnster B. 1979. Mortality and cancer morbidity among cadmium-exposed workers. *Environ Health Perspect* 28:199-204.
- Kjellstrom T., Nordberg G.F. 1978. A kinetic model of cadmium metabolism in the human being. *Environ Res* 16:248-269.
- Klaassen, C.D. 2001. Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 6th Edition, McGraw-Hill, New York
- Koepsell, H., Endou, H. 2004. The SLC22 drug transporter family, *Eur J Physiol* 447: 666-676.
- Koepsell, H., Schmitt, B.M., Gorboulev, V. 2003. Organic cation transporters, *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 150: 36-90.
- Koren, E. 1992. Cadmium, *Annuaire des minéraux du Canada 1991*, Énergie, Mines et Ressources Canada, Ottawa, Ontario.
- Kutzman R.S, Drew R.T, Shiotsuka R.N. 1986. Pulmonary changes resulting from

subchronic exposure to cadmium chloride aerosol. *J Toxicol Environ Health* 17:175-189.

Lambat, Z., Limson, J.L., Daya S. 2002. Cimetidine: antioxidant and metal-binding properties, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, Volume 54, Number 12, 1 pp. 1681-1686(6)

Larsson S.E., Piscator M. 1971. Effect of cadmium on skeletal tissue in normal and cadmium-deficient rats. *Isr J Mkd Sci* 7:495-498.

Lauwerys R., De Wals P.H. 1981. Environmental pollution by cadmium and mortality from renal diseases. *Lancet* 1:383.

LaZerte, B., Evans, D., Grauds. P.1989. Deposition and Transport of Trace Metals in an Acidified Catchment of Central Ontario, *Sci. Total Environ.*, 87188: 209-221.

Lemen R.A., Lee J.S., Wagoner J.K. 1976. Cancer mortality among cadmium production workers. *Ann N Y Acad Sci* 271:273-279.

Liu, J., Liu, Y. Habecbu, S.S. 1998. Susceptibility of MT-null mice to chronic CdCl₂-induced nephrotoxicity indicates that renal injury is not mediated by the CdMT complex. *Toxicological Sciences* 46:197-203.

Lodenius, M., Autio, S. 1989. Effects of Acidification on the Mobilization of Cadmium and Mercury from Soils, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 18: 261-268.

Lucas, P.A., Jariwalla, A.G., Jones, J.H., et al. 1980. Fatal cadmium fume inhalation. *Lancet* (July 26):205.

Lum, K.R., Kokotich E.A., Schroeder, W.H. 1987. Bioavailable Cadmium Lead and Zinc in Wet and Dry Deposition, *Sci. Total Environ*, 63: 161-174

MacLachy, J. 1992. Metals Data from Base Metal Smelters and Refineries, As, Cd, Cr, Ni, Pb, Hg, (projet de rapport inédit), Direction des programmes industriels, Environnement Canada, Ottawa Ontario.

Madon, J., Hagenbuch, B., Landmann, L., Meier, P.J., Stieger, B., 2000, Transport Function and Hepatocellular Localization of mrp6 in Rat Liver, *Molecular Pharmacology*, Vol. 57, Issue 3, 634-641

Mahraoui L., Takeda J., Mesonero J., Chantret I., Dussaulx E., Bell, G.I., Brot-Laroche E. 1994. Regulation of expression of the human fructose transporter (GLUT5) by cyclic AMP. *Biochemical Journal* 301, 169-175.

Marieb, E. 1999. Anatomie et physiologie humaines, 2ième Edition, ERPI, St-Laurent, Québec.

Martel, F., Gründemann, D., Calhau, C., Schömig E. 2001. Apical uptake of organic cations

by human intestinal Caco-2 cells: putative involvement of ASF transporters *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacology* 363 :40–49.

Mechetner, E., Kyshtoobayeva, A., Zonis S., Kim, H., Stroup, R., Garcia, R., Parker R.J., Fruehauf, J.P. 1998. Levels of multidrug resistance (MDR1) P-glycoprotein expression by human breast cancer correlate with in vitro resistance to taxol and doxorubicin, *Clinical Cancer Research*, Vol 4, Issue 2 389-398

Mourez, M., Jéhanno, M., Hofnung, M., Dassa, E. 2000. Rôle, fonctionnement et structure des transporteurs à ATP binding cassette (ABC), *Médecine/Sciences*: 386-394.

Natuse I, Hayashi Y. 1989. Amelioration of the teratogenicity of cadmium by the metallothionein induced by bismuth nitrate. *Teratology* 40:459-465.

Nordberg, G.F. 1972. Cadmium metabolism and toxicity. *Environ Physiol* 2:7-36.

Nriagu, J.O. 1980. Cadmium in the Atmosphere and in Precipitation, Cadmium in the Environment, Part 1. Ecological Cycling, J.O. Nriagu (éd.), John Wiley and Sons, Toronto (Ont.), pp.71-114.

Nriagu, J.O. 1989. A Global Assessment of Natural Sources of Atmospheric Trace Metals, *Nature*, 338: 47-49.

Nriagu, J.O., Pacyna, J.M. 1988. Quantitative Assessment of Worldwide Contamination of Air, Water and Soils by Trace Metals, *Nature*, Renal effects of low-level environmental cadmium exposure: 5-year follow-up of a subcohort from the Cadmibel: 134-139.

Nogawa K., Tsuritani I, Kido T. 1987. Mechanism for bone disease found in inhabitants environmentally exposed to cadmium: Decreased serum 1-alpha, 25dihydroxy vitamin D level. *Int Arch Occup Environ Health* 59:21-30.

Nogawa K, Tsuritani I, Kido T. 1990. Serum vitamin D metabolites in cadmium-exposed persons with renal damage. *Int Arch Occup Environ Health* 62:189-193.

Nordberg, G. F., Kjellstrom, T., Nordberg, M. 1985. Kinetics and metabolism. In *Cadmium and Health: A Toxicological and Epidemiological Appraisal: Exposure, Dose, and Metabolism* (L. Friberg, C. G. Elinder, T. Kjellstrom, and G. F. Nordberg, Eds.), pp. 103–178, Vol. 1. CRC Press, Boca Raton, FL

Omu, A.E., Fernandes, S. 2001. The Relationship between Zinc/Cadmium Ratio in Human Semen: Effect on Immune Response, *Kuwait Medical Jour*, 33 (1): 38-43

Patwardham, J.R., Finckh, E.S. 1976. Fatal cadmium-fume pneumonitis. *Med J Aust* 1:962-966.

Pauli-Magnus, C., von Richter, O., Burk, O., Ziegler, A., Mettang, T. 2000. Characterization

of the major metabolites of verapamil as substrates and inhibitors of P-glycoprotein. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 293:376—82

Petering H.G., Choudhury H., Stemmer K.L. 1979. Some effects of oral ingestion of cadmium on zinc, copper and iron metabolism. *Environ Health Perspect* 28:97-106.

Pham, T.N., Segui, J.A., Fortin, C., Campbell, P.G., Denizeau, F., Jumarie, C. 2004. Cadmium uptake in rat hepatocytes in relation to speciation and to complexation with metallothionein and albumin. *Journal of Cellular Physiology*, 201: 320-330.

Phonphok, Y., Rosenthal, K. S., 1991. Stabilization of clathrin coated vesicles by amantadine, tromantadine and other hydrophobic amines. *FEBS Lett* 281, 188–190.

Pinot, F., Freps, S.E., Bachelet, M., Hainaut, P., Bakonyi, M., Polla, B.S. 2000. Cadmium in the environment: Sources mechanisms of biotoxicity and biomarkers. *Rev Environ. Health*, 15, 299-323.

Pinto, M., Robine-Leon, S., Appay, M.D. 1983. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol Cell*; 47:323-30.

Pranav, S., Viral, J., Tamishraha, B., Ambikanandan, M. 2006. Role of Caco-2 Cell Monolayers in Prediction of Intestinal Drug Absorption, *Biotechnology Progress* 22:186-198.

Prozialeck, W. C., Lamar, P. C. 1993. Surface binding and uptake of cadmium (Cd²⁺) by LLC-PK1 cells on permeable membrane supports. *Arch. Toxicol.* 67, 113–119.

Prozialeck, W. C., Niewenhuis, R. J. 1991. Cadmium (Cd²⁺) disrupts Ca²⁺-dependent cell–cell junctions and alters the pattern of E-cadherin immunofluorescence in LLC-PK1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181, 1118–1124.

Quaroni, A. 1985. Pre- and postnatal developpement of differenciaded fonction in rat intestinal epithelial cells. *Developmental Biology*. 111: 280-292.

Rahola, T., Aaran, R.K., Miettinen, J.K. 1973. Retention and elimination of 115mCd in man. In: *Health physics problems of internal contamination*. Budapest: Akademia 213-218.

Reeves, P.G., Chaney, R.L., 2001. Mineral status of female rats affects the absorption and organ distribution of dietary cadmium derived from edible sunflower kernels (*Helianthus annus* L.). *Environ Res* 85(3):215-225.

Reeve, P.G., Chaney, R.L., 2002. Nutritional status affects the absorption and whole-body and organ retention of cadmium in rats fed rice-based diets. *Environ Sci Technol* 36:2684-2692.

Reichl, F.X., Benecke, J., 2004, *Guide pratique de toxicology*, DeBoeck, 348 pages.

Roberts, C. A., Clark, J. M. 1988. In vivo depression of reserve albumin binding capacity by cadmium: A preliminary evaluation. *Life Sci.* 42, 1369–1374.

Rodal, S.K., Skretting, G., Garred, O., Vilhardt, F., van Deurs, B., Sandvig, K. 1999. Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Mol Biol Cell* 10: 961-974.

Rousset, M., Chantret, I., Darmoul, D. 1989. Reversible forskolin-induced impairment of sucrase isomaltase mRNA levels, biosynthesis and transport to the brush border membrane in Caco-2 cells. *J Cell Physiol*; 141:627-35.

Rusch, G.M., O'Grodnick, J.S., Rinehart, W.E. 1986. Acute inhalation study in rat of comparative uptake, distribution and excretion of different cadmium containing materials. *Am Ind Hyg Assoc* 47:754-763.

Sakata, S., Iwami, K., Enoki, Y. 1988. Effects of cadmium on in vitro and in vivo erythropoiesis: Erythroid progenitor cells (CFU-E) iron, and erythropoietin in cadmium-induced iron deficiency anemia. *Exp Hematol* 16:581-587.

Schafer, L., Andersen, O., Nielsen, J.B., 1986. Effects of dietary factors on gastrointestinal Cd absorption in mice. *Acta Pharmacol Toxicol* 59 (Suppl 7):549-552.

Schafer S.G., Schwegler U., Schumann K. 1990. Retention of cadmium in cadmium-naive normal and iron-deficient rats as well as in cadmium-induced iron-deficient animals. *Exotoxicol Environ Safety* 20:71-81.

Scheffer, G.L., Scheper, R.J. 2002. Drug resistance molecules: lessons from oncology. *Novartis. Found. Symp.* 243, pp. 19–31.

Scherrer, W.D., McAvoy, D., 1994, MINEQL⁺: A Chemical Equilibrium Program for Personal Computers, Version 3.01, Environmental Research Software, Hallowell, ME.

Schoenmaker, T.J.M., Klaren, P.H.M., Flick, G., Lock, R.A.C, Pang, P.K.T., Wendelaar Bonga, S.E. 1992. Actions of cadmium on basolateral plasma membrane proteins involved in calcium uptake by fish intestine, *J. Membr. Biol.* 127-161.

Seidal, K., Jorgensen, N., Elinder, C.-G. 1993. Fatal cadmium induced pneumonitis. *Stand J Work Environ Health* 19:429-431.

Seithel, A., Karlsson, J., Hilgendorf, C., Bjorquistb, A., Ungell, A-L. 2006. Variability in mRNA expression of ABC- and SLC transporters in human intestinal cells: Comparison between human segments and Caco-2 cells, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 28: 291–299.

Shaikh, Z. A, Blazka, M. E., Endo, T. 1995. Metal Transport in Cells: Cadmium Uptake by Rat Hepatocytes and Renal Cortical Epithelial Cells, *Environ Health Perspect* 103 (Suppl

1):73-75

Sobkowiak, R., Deckert, J. 2003. Cadmium induced changes in growth and cell cycle gene expression in suspension culture cells of soybean. *Plant Physiol Biochem* 41, 767–772.

Sobkowiak, R., Deckert, J. 2004. The effect of cadmium on cell cycle control in suspension culture cells of soybean. *Acta Physiol Plant* 26, 335–344.

Sorahan, T. 1987. Mortality from lung cancer among a cohort of nickel cadmium battery workers: 1946-1984. *Br J Ind Med* 44:803-809.

Squibb, K.S., Pritchard, J.B., Fowler, B.A. 1984. Cadmium-metallothionein nephropathy: Relationships between ultrastructural/biochemical alterations and intracellular cadmium binding. *Pharmacol Exp Therap* 229: 311 - 321.

Staessen, J., Bulpitt, C.J., Roels, H. 1984. Urinary cadmium and lead and their relationship to blood pressure in a population with low average exposure. *Br J Ind Med* 4:241-248.

Steinnes, E. 1990. Lead, Cadmium and Other Metals in Scandinavian Surface Waters, with Emphasis on Acidification and Atmospheric Deposition, *Environ. Toxicol. Chem.*, 9: 825-831.

Stephenson, M., Mackie, G.L. 1988. Total Cadmium Concentrations in the Water and Littoral Sediments of Central Ontario Lakes», *Water Air Soil Pollut*, 38: 121-136.

Sugawara, N., Lai, Y-R., Sugawara, C., Arizono, K. 1998. Decreased hepatobiliary secretion of inorganic mercury, its deposition and toxicity in the Eisai hyperbilirubinemic rat with no hepatic canalicular organic anion transporter, *Volume 126, Issue 1, 20, p. 23-31*

Sutou, S., Yamamoto, K., Sendota, H. 1980. Toxicity, fertility, teratogenicity, and dominant lethal tests in rats administered cadmium subchronically. III. Fertility, teratogenicity, and dominant lethal tests. *Ecotoxicol Environ Safety* 4:51-56.

Szczycka, M.S., Wemunie, J.A., Moye-Rowley, W.S., Thiele, D. J. 1994. A Yeast Metal Resistance Protein Similar to Human Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) and Multidrug Resistance-associated Protein, *THEJ journal of biological chemistry*, Vol. 269, No. 36, pp. 22853-22857.

Tada, Y., Wada, M., Kuroiwa, K., Kinugawa, N., Harada, T., Nagayama, J., Nakagawa, M., Naito, S., Kuwano, M. 2000. MDR1 Gene Overexpression and Altered Degree of Methylation at the Promoter Region in Bladder Cancer during Chemotherapeutic Treatment, *Clinical Cancer Research* Vol. 6, 4618-4627

Tamai, I., Yabuuchi, H., Nezu, J., Sai, Y., Oku, A., Shimane, M., Tsuji, A. 1997. Cloning and characterization of a novel human pH-dependent organic cation transporter, OCTN1, *FEBS Letters* 419: 107-111.

Tandy, S., Williams, M., Leggett, A., Lopez-Jimenez, M., Dedes, M., Ramesh, B., Srai, S. K., Sharp, P. 2000 Nramp2 expression is associated with pH-dependent iron uptake across the apical membrane of human intestinal Caco-2 cells. *J. Biol. Chem.* 275, 1023–1028.

Thevenod, F. 2003. Nephrotoxicity and the proximal tubule. Insights from cadmium. *Nephron Physiol.* 93, 87-93.

Thun, M.J., Schnorr, T.M., Smith A. 1985. Mortality among a cohort of U.S. cadmium production workers--an update. *J Natl Cancer Inst* 74:325-333.

Thwaites, D.T., Brown, C.D.A., Hirst, B.H., Simmons, N.L. 1993. Transepithelial glycylsarcosine transport in intestinal Caco-2 cells mediated by expression of H⁺ - coupled carriers at both apical and basal membranes, *Journal of Biological Chemistry* 268: 7640-7642.

Traber, P.G. 1994. Differentiation of intestinal epithelial cells: lessons from the study of intestine-specific gene expression. *J. Lab. Clin. Med.* 128, 467–477.

United Nations, World Health Organization, International Agency for Research of Cancer, 1993, Cadmium and cadmium compound. In: Beryllium, Cadmium, Mercury, Exposure to the glass manufacturing industry, IARC, Monographs of the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol 58, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, pp. 119-237.

Vachon, P. H., Beaulieu, J.F. 1992. Transient mosaic patterns of morphological and functional differentiation in the Caco-2 cell line, *Gastroenterology*, Aug; 103(2):414-23

Vasil'eva V.F., Gusev G.P., Krestinskaia T.V., Burovina I.V., Ukhanov K.I. 1987. Cadmium distribution in tissues and Na,K-ATPase activity of the skin of the frog *Rana temporaria* in different routes of cadmium uptake by the body, *Zh Evol Biokhim Fiziol.*;23(3):300-4

Waalkes MP, Goering PL. 1990. Metallothionein and other cadmium-binding proteins: Recent developments. *Chemical Research in Toxicology* 3:281-288.

Waalkes, M.P., Rehm, S. 1992. Carcinogenicity of oral cadmium in the male wistar (WF/NCr) rat: Effect of chronic dietary zinc deficiency. *Fund Appl Toxicol* 19:512-520.

Wagemann, R., Capel, M. J., Hesslein, R., Stephenson, M. 1994. Sediment-water distribution coefficients and speciation of cadmium in a Canadian shield lake, *Canadian journal of fisheries and aquatic sciences*, vol. 51, no9, pp. 1951-1958

Wahlberg, J.E. 1965. Percutaneous toxicity of metal compounds. A comparative Investigation in guinea pigs. *Archives of Environnemental Health*, 11, p.201-204.

Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B., Beyersmann, D. 2003. Molecular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicol* 192, 95– 117.

- Wang C., Bhattacharyya M.H. 1993. Effect of cadmium on bone calcium and ^{45}Ca in nonpregnant mice on a calcium-deficient diet: evidence of direct effect of cadmium on bone. *Toxicol Appl Pharmacol* 120:228-239.
- Wang, L., H., Rothberg, K. G., Anderson, R. G. W. 1993. Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *J Cell Biol* 123, 1107–1117.
- Wang, Y., Fang, J., Stephen, L.S., Rao, K., Murali, K. 2004. Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Radical Biol Med* 36, 1434–1443.
- Watanabe, K., Sawano, T., Endo, T., Sakata, M., Sato, J. 2002. Studies on Intestinal Absorption of Sulpiride (2): Transepithelial Transport of Sulpiride Across the Human Intestinal Cell Line Caco-2, *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, Vol. 25, No. 10 1345
- Weaver J.L., Szabo G. Jr, Pine P.S., Gottesman M.M., Goldenberg S., Aszalos A. 1993. The effect of ion channel blockers, immunosuppressive agents, and other drugs on the activity of the multi-drug transporter. *Int. J. Cancer* 54:456–61
- Wu, X., Huang, W., Ganapathy, M.E., Wang, H., Kekuda, R., Conway, S.J., Leibach, F.H., Ganapathy, V. 2000. Structure, function and regional distribution of the organic cation transporter OCT1 in the kidney. *American journal of physiology* 279, 449-458.
- Yabuuchi, H., Tamai, I., Nezu, J-I., Sakamoto, K., Oku, A., Shimane, M., Sai, Y., Tsuji, A. 1999 Novel Membrane Transporter OCTN1 Mediates Multispecific, Bidirectional, and pH-Dependent Transport of Organic Cations, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 289: 768-773.
- Yeats, P.A., Bowers, J.M. 1987. Evidence for Anthropogenic Modification of Global Transport of Cadmium, *Cadmium in the Aquatic Environment*, J. Nriagu et J.B. Sprague (éd.), John Wiley and Sons, Toronto, Ontario, pp.19-34 .
- Young, L. C., Campling, B., G., Cole, S. P. C., Deeley, R., G., Gerlach, J. H. 2001. Multidrug Resistance Proteins MRP3, MRP1, and MRP2 in Lung Cancer, *Clinical Cancer Research* Vol. 7, 1798-1804.
- Zhang, L., Brett, C., M., Iacconi, K. M. 1998. Role of organic cation transporter in drug absorption and elimination, *Annual review of pharmacology and toxicology*, vol.38, pp. 431-460.
- Zhang, L., Gorset, W., Dresser, M.J., Giacomini, K.M. 1999. The interaction of n-tetraalkylammonium compounds with a human organic cation transporter, hOCT1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 288:1192–98
- Zweibaum A, Pinto M, Chevalier G. 1985. Enterocytic differentiation of a subpopulation of the human colon tumor cell line HL-29 selected for growth in sugar-free medium and its

inhibition by glucose. *J Cell Physiol*; 122:21-9.